DEUXIÈME ÉDITION

Gab. BERTRAND-P. THOMAS

GUIDE POUR LES MANIPULATIONS DE CHIMIE BIOLOGIQUE

H. DUNOD ET E. PINAT, ÉDITEURS

D. xv.

20/6

22102047334

Med
K11171

à M. le Prof. Dr Hallopeau
hommage des auteurs
G. Bertrand

GUIDE

POUR LES MANIPULATIONS

DE

CHIMIE BIOLOGIQUE

GUIDE

POUR LES MANIPULATIONS

DE

CHIMIE BIOLOGIQUE

PAR MM.

Gabriel BERTRAND ET **Pierre THOMAS**

Professeur à la Faculté des Sciences et à l'Institut Pasteur. | Préparateur à la Faculté des Sciences et à l'Institut Pasteur.

DEUXIÈME ÉDITION, REVUE ET AUGMENTÉE

PARIS

H. DUNOD ET E. PINAT, ÉDITEURS

47 et 49, Quai des Grands-Augustins

1913

Tous droits de reproduction, de traduction et d'adaptation réservés pour tous pays, y compris la Russie.

92833

1576

WELLCOME
HISTORICAL
MEDICAL
LIBRARY

WELLCOME INSTITUTE
LIBRARY

Coll.	wellcome mec
Call No.	QU

PRÉFACE

DE LA PREMIÈRE ÉDITION

La Chimie biologique a fait depuis quelques dizaines d'années des progrès considérables.

La création de méthodes perfectionnées d'analyse, la séparation d'une multitude de principes immédiats définis, les résultats importants, presque toujours vérifiés par la synthèse, obtenus dans l'étude de la constitution des sucres, de beaucoup d'alcaloïdes, des matières protéiques, la découverte d'un grand nombre de diastases, et surtout de nouveaux types de diastases, oxydases, zymase, etc., l'importance reconnue de certains corps, même à l'état de traces, dans les phénomènes catalytiques naturels, ont jeté sur la composition et sur le fonctionnement chimique de la matière vivante une lumière inattendue.

La Chimie biologique a pu dès lors se constituer en une branche importante de la science, ayant ses adeptes et ses laboratoires, ses méthodes et sa littérature propres.

Parmi les problèmes que la chimie biologique s'applique à résoudre, beaucoup ont un intérêt philosophique très élevé ou présentent des applications de premier ordre. Aussi devient tous les jours plus grand le nombre de ceux qui se consacrent à son étude ou qui lui

font seulement des emprunts. Les physiologistes, les médecins, les agronomes, tous ceux que leur curiosité ou leur intérêt amène à s'occuper des phénomènes chimiques de la vie des plantes et des animaux, doivent non seulement en connaître les principes, mais le plus souvent encore en appliquer les méthodes.

Il m'a semblé qu'un livre d'initiation à ces méthodes, livre suffisamment développé pour permettre à ceux qui le possèdent bien d'entreprendre des recherches originales, pourrait rendre quelques services.

Avec la collaboration de M. P. Thomas, dont le dévouement et l'activité m'ont déjà permis d'organiser l'enseignement expérimental de la chimie biologique à la Faculté des Sciences, j'ai essayé d'écrire ce livre.

Le « Guide pour les manipulations de chimie biologique » que nous publions aujourd'hui renferme un grand nombre d'exercices pratiques relatifs à la composition élémentaire et immédiate des êtres vivants, aux diastases, aux principales fermentations.

Le plan suivant lequel tous ces exercices sont exposés rappelle beaucoup celui du cours de chimie biologique de la Faculté des Sciences. Les principales modifications apportées tiennent, d'une part, à l'attention prise de ne pas aborder trop tôt des expériences difficiles, de ménager au contraire une certaine gradation ; d'autre part, à l'impossibilité d'introduire dans un ouvrage relativement élémentaire des opérations qui demandent beaucoup de temps ou qui exigent des connaissances techniques trop approfondies.

Les opérations telles que la volumétrie, l'examen au microscope, l'emploi du polarimètre et du spectroscope, la centrifugation, etc., sont décrites au fur et à mesure des besoins, pour les apprendre en les appliquant.

Les méthodes, soit pour les recherches qualitatives, soit pour les dosages, sont, ou bien des méthodes connues,

mais alors choisies, éprouvées et quelquefois perfectionnées, soit des méthodes originales et encore inédites.

Les figures ont toutes été dessinées spécialement par M. Roussel, d'après nos indications et, lorsqu'il y avait lieu, à l'aide de préparations microscopiques exécutées par nous.

Enfin, le choix des exercices est tel qu'il permet déjà un grand nombre d'applications courantes ; par exemple, à l'hygiène alimentaire (analyse du vin, du vinaigre, etc.), — à la pharmacie (titrage du quinquina, des préparations diastasiques, etc.) — au diagnostic médical (analyse des urines, etc.).

Ce livre rendra surtout service aux étudiants en Chimie biologique, mais il n'a pas été écrit pour eux seuls : nous espérons que des chercheurs, non spécialisés dans la chimie, et tentés par l'étude de certains phénomènes biologiques, y pourront trouver aussi d'utiles indications.

Avril 1910.

GABRIEL BERTRAND.

PRÉFACE

DE LA DEUXIÈME ÉDITION

Bien que la première édition de cet ouvrage ait été rapidement épuisée, nous n'avons pas voulu publier la seconde sans y introduire certains changements ou additions qui nous ont paru très utiles et pour la plupart desquels nous nous sommes inspirés des travaux récents.

Parmi les nouvelles manipulations, quelques-unes

demandent déjà une certaine éducation chimique; elles s'adressent particulièrement aux biologistes, qui y trouveront des méthodes éprouvées, leur évitant des tâtonnements et facilitant leurs recherches.

Les chapitres qui ont été le plus modifiés ou augmentés ont trait aux acides, aux alcaloïdes, aux matières protéiques et aux diastases. On trouvera, en outre, quelques manipulations concernant les phénomènes synthétiques qui s'accomplissent chez les êtres vivants.

Nous espérons que cette nouvelle édition sera aussi favorablement accueillie que la précédente et qu'elle pourra rendre plus de services encore.

Juin 1913.

G. B. et P. T.

ERRATA

Page	ligne	au lieu de :	il faut lire :
—	—	—	—
17	14	épuiser	traiter
55	9	visage	virage
141	avant-dernière	cette solution	la solution de formiate de sodium
175	12	convient	ne convient pas
310	16	ci-dessus	ci-dessous
354	21	sont alors distillés	sont légèrement acidifiés en présence d'hélianthine et distillés
389	11	eau	eau ordinaire
424	26	notre méthode	la méthode primitive
464	table	lécihine	lécithine
95	dernière	ajouter à gauche du tableau le nombre 50	

TABLE DES MATIÈRES

Pages.

Introduction XXI

PREMIÈRE PARTIE

STATIQUE

CHAPITRE PREMIER

Recherche et dosage des éléments

Recherche du carbone 1
— de l'azote 3
— du soufre 6
— du phosphore 7
Analyse qualitative des cendres végétales 9
Recherche de l'iode et du brome 14
— du manganèse 16
— du fer dans le sang 18
— du cuivre dans le sang de l'escargot 18
— du bore dans le vin 20
Dosage de l'azote (méthode de Kjeldahl) 23
Préparation de l'acide sulfurique normal 27
Dosage de l'alcalinité des cendres 30
— colorimétrique du manganèse 31
— du fer dans le sang 32

CHAPITRE II

Principes immédiats incombustibles

Recherche des nitrates 35
— des nitrites 37
— des sulfocyanates 38

Pages.
Dosage de l'eau 39
Incinération 41
Dosage des chlorures dans l'urine 43
Manière d'être de l'acide phosphorique et des phosphates en présence des divers indicateurs 48
Titrage de l'acide phosphorique et des phosphates alcalins .. 50
Dosage de l'acide phosphorique 54

CHAPITRE III

Glucoses et sucres hydrolysables

Matières sucrées et saccharigènes 59
Sucres réducteurs. Action caramélisante des alcalis 60
Propriétés réductrices. Préparation du réactif cupro-potassique 61
Réactions colorées (réactions furfuriques) 64
Production et caractérisation du furfurol 66
Action de la phénylhydrazine sur les sucres 67
Action isomérisante des alcalis 72
Détermination du point de fusion 73
Acides dérivés des sucres 75
Principaux sucres hydrolysables et glucoses qui en dérivent. 80
Interversion du saccharose 81
Recherche des principaux sucres réducteurs 82
Réaction colorée du lactose 84
Dosage volumétrique des sucres réducteurs 85
Tables pour le dosage des sucres réducteurs 92
Polarimétrie 101
Défécation des liquides sucrés 107

CHAPITRE IV

Mannites

Préparation de l'éther acétique de la mannite 111
— de l'acétal de la mannite 112
Caractères de l'inosite 116

CHAPITRE V

Polysaccharides élevés

Caractères microscopiques des amidons de diverses provenances 118
Saccharification de l'amidon par l'acide chlorhydrique 122

Pages.
Extraction et caractères du glycogène 123
Hydrolyse de l'ivoire végétal 127
Caractères des gommes solubles 128
Dissolution de la cellulose 128
Réactions colorées de la cellulose 130
Hydrolyse de la cellulose 131
Réactions microchimiques des tissus végétaux 131

CHAPITRE VI

Glucosides

Préparation de l'amygdaline 134
Dédoublement de l'arbutine 137

CHAPITRE VII

Acides de la série grasse

Caractères des acides de la série acétique 140
— de l'acide formique 141
Détermination des acides gras volatils 142
Caractères de l'acide acétique 143
— l'acide butyrique 143
— l'acide oxalique 144
— l'acide succinique 145
— l'acide lactique 145
— l'acide malique 149
— l'acide tartrique 149
— l'acide citrique 151
Recherche et dosage de l'acide acétique dans le vinaigre 152
— — l'acide succinique dans un liquide fermenté 155
Titrage d'une solution d'acide lactique 156
Recherche et dosage de l'acide tartrique dans le vin 158

CHAPITRE VIII

Phénols et acides aromatiques

Coloration des phénols avec le chlorure ferrique 160
— — avec le réactif de Millon 161
Caractères de l'acide benzoïque 162
— l'acide salicylique 163

Pages.
Préparation de l'acide salicylique par saponification de l'essence de Wintergreen..... 164
Caractères des tannins..... 164
Dosage des tannins dans les matières tannantes..... 166
— des sulfoconjugués urinaires..... 167

CHAPITRE IX

Matières grasses et glycérine

Caractères des matières grasses..... 171
Formation des acides gras par saponification du suif..... 172
Séparation des acides gras non saturés..... 173
Point de fusion des acides gras..... 175
Réactions de la glycérine..... 177
Détermination de l'indice de saponification..... 179
— de l'indice d'iode..... 180
Dosage de la matière grasse contenue dans une graine..... 182
— du beurre dans le lait..... 183
— des matières grasses dans les tissus animaux..... 184

APPENDICE

Phosphatides

Lécithines..... 188
Préparation de la lécithine de l'œuf..... 189
Hydrolyse de la lécithine et caractérisation de la choline... 190

CHAPITRE X

Essences végétales et terpènes

Composés terpéniques et essences..... 192
Extraction d'une essence par distillation avec la vapeur d'eau 192
Réaction du pinène..... 193
Dosage des éthers dans l'essence de lavande..... 194
Principaux éthers contenus dans les essences..... 195
Dosage des alcools dans l'essence de menthe..... 196
Principaux alcools contenus dans les essences..... 198
Dosage de l'aldéhyde cinnamique dans l'essence de cannelle. 198
Principaux aldéhydes contenus dans les essences..... 199
Dosage des phénols dans une essence..... 200
Principaux phénols contenus dans les essences..... 201

APPENDICE

Cholestérine et acides biliaires

Pages.
Réactions de la cholestérine 201
Réactions des acides biliaires 204
Dosage de la cholestérine dans les tissus 206

CHAPITRE XI

Alcaloïdes

Réactions de précipitation des alcaloïdes 208
— colorées des alcaloïdes 209
Dosage simplifié de la quinine dans l'écorce de quinquina. 213
Recherche des principaux alcaloïdes solides 214
Dosage de la nicotine dans le tabac 217

CHAPITRE XII

Substances protéiques : protéines

Substances protéiques 219
Réactions de précipitation des substances protéiques 220
— colorées des substances protéiques 222
Protéines animales. Séparation des albumines et des globulines 226
Cristallisation de l'albumine 228
Préparation du fibrinogène 229
Protéines végétales 230
Préparation de l'édestine 231
Extraction du gluten. Séparation de la gliadine et de la gluténine 234
Recherche de l'albumine dans l'urine 235
Dosage de l'albumine dans l'urine 237

CHAPITRE XIII

Produits d'hydrolyse des protéines

Principaux produits de dédoublement des protéines 239
Hydrolyse acide des substances protéiques du sérum 240
Réactions des acidalbumines et des alcalialbumines 242
Caractères des albumoses et peptones 242
Réactions des protéines, albumoses et peptones 243

Pages.
Caractères généraux des acides aminés..... 244
Préparation du glycocolle (ou glycine)..... 245
Caractères du glycocolle (ou glycine)..... 246
— de l'acide hippurique..... 247
— de la leucine..... 248
— de l'acide aspartique..... 248
Préparation de l'acide glutamique..... 248
Caractères de la phénylalanine..... 249
— de la tyrosine..... 250
Réactions du tryptophane..... 252
Dosage des acides aminés..... 252

CHAPITRE XIV

Amides

Caractères de l'asparagine..... 255
Hydrolyse de l'asparagine et formation d'aspartate cuivrique 255
Dosage de l'asparagine..... 256
Caractères de l'urée. Recherche de l'urée dans l'urine..... 257
Dosage de l'urée dans l'urine..... 258
Transformation du volume de l'azote en poids..... 263

CHAPITRE XV

Protéides et dérivés

Généralités sur les protéides..... 265
Glucoprotéides..... 265
Préparation de la mucine..... 266
— de l'ovomucoïde..... 267
Phosphoprotéides..... 268
Préparation de la caséine du lait..... 269
— de l'ovovitelline..... 269
Nucléoprotéides..... 270
Extraction de la ferratine du foie..... 271
Préparation de l'acide nucléique de la levure..... 272
Hydrolyse de l'acide nucléique et séparation des produits d'hydrolyse..... 273
Réactions générales des composés puriques..... 275
Recherche de l'acide urique et de la caféine (réaction de la murexide)..... 276
Réaction de la guanine et de la xanthine..... 277
Dosage de la caséine dans le lait..... 277
— de l'acide urique et des bases puriques dans l'urine.. 278
— de la caféine..... 282

CHAPITRE XVI

Pigments

Pages.
Hémoglobine..... 284
Cristallisation de l'oxyhémoglobine 284
Préparation de l'oxyhémoglobine..... 287
Recherche du sang par la formation des cristaux de chlorhydrate d'hématine..... 288
Caractères spectroscopiques de l'hémoglobine..... 289
Réaction des pigments biliaires..... 292
Recherche des pigments biliaires dans l'urine..... 293
— de l'urobiline dans l'urine..... 294
— des pigments dérivés de l'indol et du scatol dans l'urine..... 295
Préparation de la solution de chlorophylle..... 296
Examen spectroscopique de la chlorophylle..... 297
Produits de dédoublement et relation de l'hémoglobine et de la chlorophylle..... 299
Extraction du carotène des feuilles vertes..... 300
Réactions colorées du carotène..... 301

DEUXIÈME PARTIE

DYNAMIQUE

CHAPITRE XVII

Hydrolases

Généralités sur les diastases..... 303
Préparation d'une solution de sucrase de la levure..... 306
Influence de la réaction et de la température sur la sucrase. 306
— de la quantité de sucrase sur l'hydrolyse du sucre. 307
Préparation de l'émulsine d'amandes..... 308
Action de l'émulsine sur divers glucosides..... 309
Formation de l'essence d'amandes amères..... 310
Caractères de l'acide cyanhydrique..... 310
Dosage de l'acide cyanhydrique..... 311
Recherche des glucosides cyanhydriques dans les feuilles... 314

Pages.
Localisation de la diastase et du glucoside dans certaines graines 314
Préparation de l'extrait diastasique de malt 315
Liquéfaction de l'empois d'amidon par l'amylase 316
Saccharification diastasique de l'amidon 317
— du glycogène par l'amylase salivaire 319
Dosage approché des produits de la saccharification par la densité de la solution 320
Monobutyrinase du sérum 320
Saponification de l'acétate et du butyrate d'éthyle par la monobutyrinase 322
Etude de la lipodiastase des graines de ricin 324
— d'une présure végétale 325
Influence des sels de calcium sur la coagulation du lait par la présure 326
Détermination de la force coagulante d'une présure 327
Coagulation diastasique du sang 328
Essai de la pepsine commerciale 330
— de la trypsine commerciale 332
Action de la papaïne sur les substances protéiques du sérum. 333
Etude de l'uréase végétale 334

CHAPITRE XVIII

Oxydases

Préparation d'une solution de laccase 336
Réactions colorées de la laccase 337
Action des acides sur la laccase 339
Préparation de la tyrosinase du son 340
Action de la tyrosinase sur la tyrosine 341
Distinction des peptones pepsique et trypsique par la tyrosinase 342
Séparation de la laccase et de la tyrosinase par la chaleur.. 543
Recherche exacte des oxydases 344

APPENDICE

Peroxydiastases

Réaction peroxydiastasique du sang 346
Application des propriétés peroxydiastasiques à la différenciation du lait cru et du lait bouilli 347
Recherche des peroxydiastases en présence des oxydases... 348

CHAPITRE XIX

Clastases

Pages.
Préparation de la zymase de levure..... 349
— d'une solution de catalase animale..... 351
Mesure de l'action de la catalase..... 351
Titrage de l'eau oxygénée..... 352

APPENDICE

Ferment glycolytique du sang..... 353
Dosage du sucre dans le sang..... 354

CHAPITRE XX

Notions de technique microbiologique

Généralités..... 356
Milieux de culture..... 357
Stérilisation à l'autoclave..... 359
Préparation et stérilisation des pipettes Pasteur..... 360
Ensemencement des milieux de culture..... 361
Séparation et isolement des germes..... 362
Isolement des anaérobies..... 365
Fixation et coloration des microbes..... 368
Double coloration..... 370

CHAPITRE XXI

Etude des principales fermentations

Fermentation alcoolique..... 376
— lactique..... 379
— acétique..... 380
Oxydation de la glycérine par la bactérie du sorbose 384
Fermentation ammoniacale..... 385
— butyrique..... 387

APPENDICE

Séparation des actions diastasiques et des actions microbiennes

Filtration à la bougie..... 390

CHAPITRE XXII

Recherche et dosage des principaux produits de fermentation

Pages.
Recherche de l'alcool 394
Dosage de petites quantités d'alcool 397
— de l'alcool dans le vin 400
Recherche de l'aldéhyde 403
Dosage de l'aldéhyde 404
Recherche de l'acétone 405
Dosage de l'acétone 407
Recherche de l'acétylméthylcarbinol 408
— et extraction de l'acide lactique 409
— et dosage de l'acide succinique 411
— — des acides volatils par la méthode de Duclaux 411
Recherche de l'ammoniaque 428
Dosage de l'ammoniaque 430
Recherche de l'indol 433
— du scatol 435

CHAPITRE XXIII

Phénomènes synthétiques

Assimilation des éléments. Culture de l'Aspergillus niger sur liquide Raulin 436
Assimilation chlorophyllienne : dégagement d'oxygène 439
Production d'aldéhydes volatils dans les feuilles vertes 440
Réactions de l'aldéhyde formique 440
Fixation de l'azote par les bactéries 443

Données numériques

Poids atomiques des principaux éléments 447
Densités correspondant aux degrés Baumé 448
— des solutions aqueuses d'ammoniaque 449
— — de potasse 449
— — de soude 450
— de l'acide chlorhydrique 451
— de l'acide nitrique 452
— de l'acide sulfurique 453
Quantités d'eau à ajouter à un alcool de titre donné pour le ramener à un titre inférieur 454
Tensions de la vapeur d'eau de 10 à 30° 455
Solubilités de quelques corps dans l'eau 455
Données relatives aux sucres et à leurs dérivés 456
Constantes des principales matières grasses 456
TABLE ANALYTIQUE 458

INTRODUCTION

En commençant, nous croyons utile de rappeler un certain nombre de principes qui permettront aux débutants de tirer de ce livre le meilleur parti possible.

1. Il est indispensable, avant d'entreprendre une opération au laboratoire, de connaître les notions théoriques qui s'y rapportent. On lira ensuite avec attention le mode opératoire indiqué, de manière à se rendre un compte exact de toutes les particularités qu'il présente.

2. Si l'on n'arrive pas du premier coup au résultat cherché, il ne faut pas craindre de recommencer l'opération jusqu'à complète réussite. Quand on sait effectuer convenablement une manipulation, il est recommandable de se perfectionner dans la recherche, en la répétant sur des quantités de plus en plus petites, jusqu'à ce que l'on soit arrivé à la limite de sensibilité des réactions ; s'il s'agit d'un

dosage, on s'appliquera à en augmenter la précision en s'entourant de précautions de plus en plus rigoureuses. En général, lorsqu'on arrive à doser une substance à 1 $^0/_0$ près, on atteint déjà une bonne approximation ; il est cependant des cas où ce degré de précision peut être dépassé.

3. Nous rappellerons à ce sujet qu'il y a une grande différence entre l'erreur absolue et l'erreur relative, au point de vue des conclusions à tirer de l'expérience. Il est des cas où l'erreur absolue est importante à considérer, d'autres où c'est l'erreur relative. S'agit-il de rechercher une très petite quantité de substance dans un tissu organique, il faut que l'erreur absolue, représentée ici par la limite de sensibilité de la réaction, soit plus petite que la quantité à rechercher, sinon on pourrait ne pas retrouver cette substance, et la conclusion serait négative au lieu d'être positive.

S'il s'agit au contraire de déterminer la quantité d'une substance facilement dosable contenue dans un mélange, l'erreur absolue pourra être de peu d'importance, puisqu'il sera toujours possible d'augmenter la quantité de matière analysée de façon à avoir une bonne approximation. Dans ce cas, le coefficient d'erreur relative limitera seul la précision de la recherche.

4. Nous ne saurions trop recommander, en par-

ticulier à ceux qui débutent, d'opérer *toujours* par comparaison, sur l'échantillon à examiner et sur une quantité convenable d'une substance de composition connue, renfermant l'élément ou la combinaison que l'on recherche ou que l'on dose. Par exemple, pour rechercher l'iode dans la glande thyroïde, on opère comparativement avec une solution titrée et très diluée d'iodure de potassium ; si on veut doser l'acide phosphorique dans un organe, on effectuera en même temps un dosage dans un sel de composition bien définie et très stable (ni efflorescent ni hygroscopique), tel que le phosphate acide d'ammonium ; et ainsi de suite.

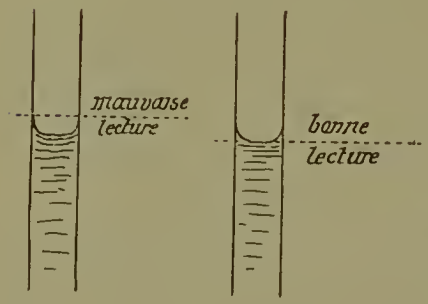
5. Une autre précaution qu'il faut prendre surtout dans les recherches délicates, portant sur de petites quantités de substance, est l'essai des réactifs. On fera ce que l'on appelle une *expérience à blanc*, avec les mêmes réactifs employés dans les mêmes proportions, mais sans la matière à analyser. Si cet essai indique la présence du corps cherché, on devra rejeter les réactifs ou bien les purifier. On peut aussi opérer quantitativement et déduire du résultat de l'analyse la quantité trouvée dans l'essai à blanc.

Pour terminer, nous rappelons brièvement les précautions à prendre, soit au point de vue de la réussite des opérations, soit pour sauvegarder les

appareils ou se prémunir contre les accidents de personnes :

1. Éviter chaque fois que cela n'est pas prescrit l'emploi d'un notable excès de réactif et, dans ce but, se servir d'une pipette ou d'un tube de verre effilé qui permet au besoin de verser goutte à goutte.

2. Lorsqu'on utilise un instrument gradué ou jaugé, ne pas oublier d'effectuer la lecture en faisant passer la ligne de visée par la partie *inférieure* du ménisque [1].



3. Quand on mesure un liquide avec une pipette, on doit appuyer l'extrémité effilée de celle-ci contre la paroi du vase dans lequel on fait le prélèvement, au moment où on détermine l'affleurement au trait de jauge, et contre la paroi du vase dans lequel on verse, au moment où s'arrête l'écoulement.

Dans ces conditions, le liquide qui s'écoule librement correspond au volume indiqué sur la pipette.

---

[1] Dans le cas des liquides opaques, comme le permanganate de potassium, le lait, etc., on pourra faire la lecture à la partie supérieure du ménisque, à la condition de mesurer le volume par différence, à l'aide d'une burette ou d'une pipette à deux traits.

4. Dans les pesées précises, on évitera l'influence de l'état hygrométrique de l'air sur le vase qui renferme la prise d'essai en se servant comme tare d'un second vase de même nature et de mêmes dimensions que le premier.

5. On doit veiller à la propreté des instruments, balances, microscope, spectroscope, polarimètre, etc. Si un réactif vient à tomber sur le plateau d'une balance, la platine d'un microscope, l'enlever aussitôt. Veiller particulièrement à ce que les objectifs ne soient jamais en contact avec le liquide des préparations.

6. Les appareils jaugés et gradués doivent être également tenus dans un grand état de propreté; on ne doit *jamais souffler* dans une pipette, ce qui introduirait des matières grasses. Les vases jaugés doivent être employés exclusivement aux mesurages; on ne doit pas les chauffer, autant que possible, ni verser de liquides chauds dans les éprouvettes graduées, comme d'ailleurs dans tous les récipients en verre épais, afin de ne pas en provoquer la rupture.

7. Quand on a fait le vide dans un appareil, ne pas oublier d'interrompre la communication avec la trompe *avant de fermer* le robinet d'eau, sinon il se produirait une rentrée d'eau.

8. La distillation de certains liquides est souvent accompagnée de soubresauts ; on pourra éviter ceux-ci et les projections qui en résultent, en introduisant dans le ballon distillatoire quelques petits grains de pierre ponce ou mieux quelques fragments de bois (p. ex. d'allumettes).

Si l'ébullition s'accompagne de la formation d'une mousse abondante, on pourra faire tomber celle-ci par addition de quelques gouttes d'huile.

9. Quand on fait bouillir un liquide dans un tube à essai, on doit maintenir continuellement le liquide en agitation, afin d'éviter une projection brusque en dehors du tube. Malgré cette précaution, il arrive parfois que des projections aient lieu ; aussi convient-il de diriger l'ouverture du tube de manière à n'atteindre personne si cet accident se produisait.

10. Lorsqu'on allume les brûleurs d'un appareil chauffé au gaz, four à moufle, autoclave, etc., il peut se produire un mélange de gaz et d'air, donnant lieu à une explosion au contact de la flamme, si on tarde trop à présenter celle-ci à l'ouverture des brûleurs après avoir ouvert le robinet de gaz.

On doit d'abord ouvrir le robinet pour chasser l'air contenu dans la rampe à gaz ; on le ferme ensuite, on présente immédiatement la flamme

à l'orifice du brûleur, et on ouvre de nouveau le robinet.

On évite ainsi de produire d'une part une explosion, d'autre part l'allumage intérieur du brûleur à gaz.

11. Il ne faut jamais manipuler de liquide inflammable tel que l'alcool absolu, l'éther et *surtout le sulfure de carbone*, au voisinage d'une flamme (les vapeurs de ce dernier corps s'enflamment même au contact du feu d'une cigarette). Quand on veut évaporer un liquide de ce genre, on doit prendre de grandes précautions ; au besoin, on utilise un bain-marie contenant de l'eau que l'on a chauffée à part et que l'on renouvelle au fur et à mesure.

12. S'il se produit une inflammation, on pourra l'éteindre de différentes manières, suivant les cas. Si la flamme se produit à l'ouverture d'un vase à col étroit, on recouvrira simplement cette ouverture avec un torchon plié ; si c'est dans une capsule ou un vase largement ouvert, on essaiera d'étouffer le feu en recouvrant avec une terrine ou un seau. Si ces moyens ne réussissent pas, on ajoutera de l'eau si le liquide enflammé est de l'alcool, du sable s'il s'agit d'éther, benzine, sulfure de carbone ou d'un autre dissolvant insoluble dans l'eau.

Dans le cas où l'on mettrait le feu à ses vêtements, directement ou en renversant un liquide enflammé, ne pas oublier que l'usage de linges mouillés est le plus efficace pour arrêter le feu.

13. Quand on travaille avec des substances qui dégagent des vapeurs suffocantes, brome, anhydride acétique, chlorure de benzoyle, etc., il est utile d'opérer, soit à l'air libre, soit sous une hotte munie d'un bon tirage. Pour le cas où l'on viendrait à être incommodé par les vapeurs, on placera d'avance à côté de soi un valet ou un verre à pied, afin de pouvoir poser au besoin le ballon ou le tube dans lequel on opère.

14. Lorsqu'on étudie les espèces microbiennes ou les moisissures, il ne faut jamais en répandre sur les tables, les vêtements ou les mains ; si cet accident se produit, il est recommandable de laver les endroits contaminés avec une solution antiseptique (formol à 1/100 ou chlorure mercurique à 1/1000), même dans le cas où l'on ne considère pas les microbes étudiés comme absolument pathogènes. Les vases ayant contenu des cultures seront stérilisés par ébullition avec une solution alcaline étendue ou à l'autoclave.

PREMIÈRE PARTIE

STATIQUE

CHAPITRE I

RECHERCHE ET DOSAGE DES ÉLÉMENTS

Recherche du carbone

1. — C'est la présence du carbone, uni à l'hydrogène et presque toujours à d'autres éléments (oxygène, azote, etc.), qui caractérise les substances organiques. Pour distinguer ces dernières des corps minéraux, on est donc amené à y rechercher le carbone.

Les substances organiques sont combustibles ; elles brûlent lorsqu'on les porte dans la flamme, au contact de l'air.

D'autre part, si on les chauffe fortement dans un tube à essai, elles brunissent, puis noircissent en gé

néral par suite de la mise en liberté de carbone ; mais ce caractère est insuffisant. Par exemple, l'acide oxalique $(CO.OH)^2 + 2H^2O$ se décompose par la chaleur sans carbonisation ; d'autre part, l'hydrate de cuivre $Cu(OH)^2$, chauffé, passe du bleu au noir, etc.

2. — On reconnait qu'une substance contient du carbone organique à ce que, chauffée fortement avec de l'oxyde de cuivre, elle donne un dégagement de gaz carbonique, l'oxyde étant réduit en même temps à l'état de cuivre métallique.

Pour faire la recherche, on introduit dans un tube à essai en verre vert un mélange de 1 à 2 décigrammes de la substance à étudier (acide oxalique, par exemple) avec 5 grammes d'oxyde noir de cuivre pulvérisé ; le tube étant bouché avec un bouchon de caoutchouc muni d'un tube de verre coudé à angle droit et maintenu horizontalement au moyen d'une pince, on chauffe peu à peu le mélange jusqu'au rouge sombre, en maintenant l'extrémité du tube à dégagement plongée dans de l'eau de chaux ou de baryte bien limpide, contenue dans un verre à pied. Le liquide se trouble (formation de carbonate de calcium ou de baryum), et le contenu du tube devient miroitant, rouge (cuivre réduit). Retirer le tube à dégagement du liquide avant de cesser le chauffage, pour éviter l'absorption.

(Se rappeler que les carbonates facilement décomposables par la chaleur pourraient être distingués des matières organiques en ce qu'ils font effervescence avec l'acide chlorhydrique dilué).

3. — Les matières organiques, chauffées avec une

dissolution sulfurique d'acide chromique, réduisent ce dernier et la couleur jaune du mélange vire au vert (formation de sulfate de chrome vert).

On place dans un tube à essai une petite quantité de substance (quelques centigrammes suffisent), puis on verse 5 centimètres cubes d'acide sulfurique pur, 1 centimètre cube de bichromate de potassium à 2 $^0/_0$, et on agite pour mélanger.

Si la coloration jaune persiste, on chauffe peu à peu mais sans atteindre l'ébullition du liquide.

Une coloration vert olive ou vert franc indique la présence du carbone (à condition qu'il n'existe pas en même temps de substances minérales réductrices).

Recherche de l'azote

4. — En général, les substances azotées dégagent lorsqu'on les chauffe fortement une odeur de corne brûlée, mais cette indication ne peut suffire. On recherche l'azote en le transformant soit en ammoniaque, soit en cyanure.

5. — *Transformation de l'azote en ammoniaque par la chaux sodée* (Will et Warrentrapp). On chauffe au rouge sombre, dans un tube, une petite quantité de substance ($0^{gr},2$ environ) avec 3 à 4 grammes de chaux sodée. L'orifice du tube étant *soigneusement essuyé* avec du papier, pour enlever les parcelles de chaux adhérentes, on y présente un fragment de papier de tournesol rouge préalablement mouillé; ce papier bleuit sous l'action de l'ammoniaque si la substance est azo-

tée. On peut aussi reconnaître l'ammoniaque à l'odeur et aux fumées blanches de chlorure d'ammonium qui se forment si on approche de l'ouverture du tube un agitateur mouillé d'acide chlorhydrique concentré.

Pour les réactions de l'ammoniaque, voir § **528**.

6. — *Transformation de l'azote en cyanure par le sodium* (Lassaigne). On emploie un petit tube à essai de 10 centimètres de longueur sur environ 5 millimètres de diamètre, dans lequel on introduit un petit fragment de la substance à essayer (de la grosseur d'une graine de moutarde) et un fragment de sodium quatre fois plus gros. On chauffe doucement jusqu'à fusion du métal, puis jusqu'au rouge sombre. On plonge le tube encore chaud dans 3 à 5 centimètres cubes d'eau contenus dans un verre. Le tube se brise; on délaie son contenu dans l'eau, on filtre et on lave le résidu avec 1 centimètre cube d'eau.

Il est essentiel, dans cette opération, de ne jamais tourner l'orifice du tube vers le visage, afin d'éviter les projections toujours possibles et dangereuses de sodium. Le chauffage doit être poussé jusqu'à destruction totale des substances goudronneuses, afin d'avoir une solution incolore.

En présence du sodium, le carbone et l'azote de la matière organique donnent naissance à du cyanure de sodium, qui se dissout ultérieurement dans l'eau. On reconnaîtra la présence de ce corps par les réactions suivantes :

7. — La moitié du liquide filtré est chauffée très légèrement avec un petit cristal de sulfate ferreux

(comme une tête d'épingle ou un grain de mil au plus) en agitant à l'air. La solution, qui doit être alcaline, est refroidie, puis nettement acidifiée par l'acide chlorhydrique étendu, en présence d'un fragment de papier de tournesol ; la formation d'une coloration ou d'un précipité bleu (bleu de Prusse dû à l'action du ferrocyanure sur l'excès de sel de fer qui s'est peroxydé) indique que la substance essayée est azotée. Si la coloration ne se produit pas, on ajoute une goutte d'une solution *étendue* de chlorure ferrique, afin d'être certain qu'il y a du fer au maximum. Si l'on a un doute, on peut filtrer le liquide bleuâtre sur un petit filtre qui arrête le précipité et se teint en bleu.

8. — L'autre moitié de la solution est portée à l'ébullition pendant une à deux minutes avec 3 ou 4 gouttes de solution de sulfure d'ammonium jaune ; après refroidissement, on acidifie par l'acide chlorhydrique étendu, on fait bouillir pour chasser l'hydrogène sulfuré, on filtre pour enlever le soufre qui rend le liquide laiteux et on refroidit complètement ; en ajoutant goutte à goutte une solution diluée de chlorure ferrique, on obtient une coloration rouge, si la matière est azotée.

La méthode au sodium est plus sensible que celle à la chaux sodée, excepté dans certains cas (alcaloïdes oxygénés [1]).

---

[1] Ces méthodes ne conviennent pas pour la recherche de l'azote dans les composés organiques nitrés, bien entendu. Ceux-ci se reconnaissent à ce qu'ils donnent lieu par chauffage à la production de vapeurs nitreuses, souvent avec détonation.

Il est nécessaire d'éviter les dilutions, en prenant juste les quantités d'eau ou de réactifs strictement indispensables.

Recherche du soufre

9. — La présence du soufre peut être constatée par sa transformation soit en sulfure, soit en sulfate, que l'on caractérise ensuite.

Transformation du soufre en sulfure de sodium. On peut transformer le soufre organique en sulfure de sodium en opérant comme pour la recherche de l'azote par le sodium (ci-dessus, § **6**).

La solution alcaline obtenue après filtration est additionnée de quelques gouttes d'une solution étendue de nitroprussiate de sodium : une coloration violette indique la présence du sulfure.

10. — *Transformation du soufre en sulfure de plomb.* Cette réaction n'est possible qu'avec certains composés, comme les matières protéiques, la cystine, etc.

On verse dans un tube à essai quelques gouttes de solution d'acétate de plomb, puis assez de solution de soude à 10 $^0/_0$ pour redissoudre l'hydrate de plomb qui se précipite d'abord. On ajoute la substance et on fait bouillir doucement pendant quelques minutes; une coloration noire (due au sulfure de plomb) indique la présence du soufre.

Cette réaction est moins sensible que la précédente, car une partie seulement du soufre organique est transformable en sulfure de plomb par ce procédé.

11. — *Transformation du soufre en sulfate.* On introduit dans une petite capsule de nickel une faible quantité de substance à essayer ($0^{gr},2$ environ) avec 3 pastilles de potasse ; on mouille celles-ci avec 3 ou 4 gouttes d'eau et on chauffe la capsule, placée sur un triangle en terre de pipe, jusqu'à fusion de la masse, en remuant avec un fil de fer.

Quand le mélange est bien homogène, on ajoute par petites portions, avec la pointe d'un canif, du nitrate de potassium pulvérisé, tant que la masse est colorée ($0^{gr},1$ à $0^{gr},2$ suffisent en général). On laisse refroidir, puis on reprend par 3 à 5 centimètres cubes d'eau. On chauffe doucement pour faciliter la dissolution, on verse le liquide dans un tube à essai, on lave avec 1 centimètre cube d'eau et on ajoute l'eau de lavage à la solution obtenue. Ce liquide est alors acidifié avec l'acide chlorhydrique étendu (en présence d'un fragment de papier de tournesol), puis filtré. En y ajoutant goutte à goutte une solution de chlorure de baryum, on obtient un précipité blanc (de sulfate de baryum) si la substance était sulfurée.

Il est bon de vérifier que les réactifs employés (pastilles de potasse, nitrate, acide chlorhydrique) ne renferment pas de sulfates, en faisant une opération à blanc.

Recherche du phosphore

12. — Pour caractériser le phosphore, on le transforme en acide phosphorique, par la fusion alcaline, en opérant comme dans la recherche du soufre (ci-dessus, § **11**).

La masse fondue est reprise par 3 à 5 centimètres cubes d'eau ; on chauffe légèrement et on filtre, s'il est nécessaire. On neutralise par l'acide nitrique étendu et on caractérise l'acide phosphorique par les deux essais suivants :

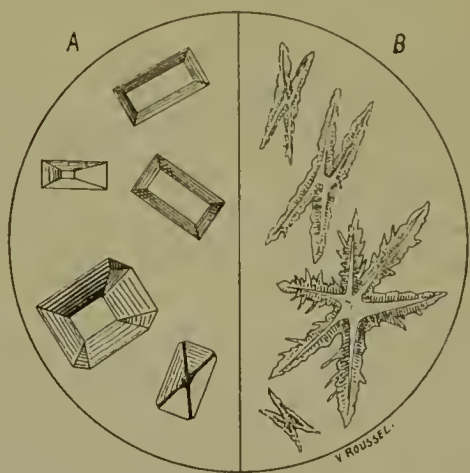


Fig. 1. — Phosphate ammoniaco-magnésien.
A, cristallisation lente ; B, cristallisation rapide.

13. — Un centimètre cube du liquide est additionné de son volume de solution de nitrate d'ammonium à 30 % et de 3 à 5 gouttes d'acide nitrique concentré. On chauffe presque jusqu'à l'ébullition et on ajoute 2 centimètres cubes de solution de molybdate d'ammonium à 3 %. Si la substance est phosphorée, il se produit un précipité jaune de phosphomolybdate d'ammonium [1].

---

[1] Ce procédé doit être préféré à celui qui consiste dans l'emploi d'un réactif nitromolybdique préparé à l'avance, dont la conservation est difficile.

14. — Le reste du liquide est additionné de 1 centimètre cube d'une solution de chlorure d'ammonium à 10 $^0/_0$ et de 1 centimètre cube d'une solution de sulfate de magnésium à 10 $^0/_0$, puis d'un excès d'ammoniaque (2 à 3 centimètres cubes), dans un verre à pied ; par l'agitation, on obtient un précipité blanc cristallin de phosphate ammoniaco-magnésien, si la matière étudiée renferme du phosphore. Examiné au microscope, ce précipité présente un aspect caractéristique (*fig.* 1).

Analyse qualitative des cendres végétales

15. — La préparation des cendres et les précautions à prendre pendant l'incinération sont décrites § **61**.

Prendre 2 grammes de cendres de bois et les triturer dans un mortier avec 20 centimètres cubes d'eau. Jeter sur un filtre, laver le résidu avec 10 centimètres cubes d'eau, en deux fois.

Le liquide alcalin, qui contient la partie soluble des cendres, est divisé en cinq portions égales.

16. — *Recherche des sulfates.* La première est acidifiée nettement avec l'acide chlorhydrique concentré (quelques gouttes) en présence d'un fragment de papier de tournesol. Il se dégage du gaz carbonique, montrant la présence de carbonates solubles dans les cendres. Par addition ultérieure d'une solution de chlorure de baryum, on a un précipité blanc qui indique la présence des sulfates.

17. — *Recherche des chlorures.* La seconde portion,

acidifiée par l'acide nitrique et additionnée d'une solution étendue de nitrate d'argent, donne un précipité blanc, caillebotté, qui se rassemble facilement par agitation. Ce précipité, soluble dans l'ammoniaque, indique la présence des chlorures.

18. — *Recherche du potassium.* La troisième portion, acidulée par l'acide nitrique, est additionnée goutte à goutte d'acide perchlorique, qui donne un précipité blanc, cristallin, de perchlorate de potassium (peu soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool).

19. — On peut également déceler le potassium dans cette partie du liquide en la neutralisant très exactement par l'acide acétique et ajoutant quelques centimètres cubes de solution saturée de picrate de sodium. Le liquide reste d'abord limpide, puis se trouble après quelques instants, par suite de la formation d'un précipité jaune cristallisé en fines aiguilles (picrate de potassium très peu soluble), surtout si on l'agite fortement.

20. — Le potassium est encore plus facile à caractériser à l'état de chloroplatinate, qui cristallise en octaèdres jaunes très peu solubles dans l'alcool étendu. Pour cela, on place dans un verre de montre $0^{cm3},5$ du liquide de lavage des cendres, on acidule par quelques gouttes d'acide chlorhydrique étendu, on ajoute trois gouttes de solution de chlorure de platine à 10 $^0/_0$ et on évapore sur le bain-marie jusqu'au tiers du volume (mais non à sec). On délaie dans 1 centimètre cube d'alcool; il se fait un précipité jaune de chloroplatinate

de potassium cristallisé qu'on peut examiner au microscope (*fig.* 2) ; la solution jaune qui surnage renferme le chloroplatinate de sodium.

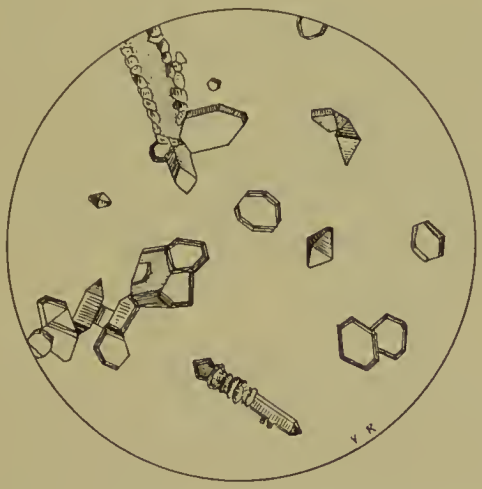


Fig. 2. — Chloroplatinate de potassium.

21. — *Recherche du sodium.* Le reste du liquide peut être employé à la recherche du sodium. Les sels de sodium ne précipitent ni par l'acide picrique, ni par l'acide perchlorique, ni par le chlorure de platine ; en revanche, si on additionne leur solution d'antimoniate de potassium et si on fait bouillir pendant une minute environ, on obtient par refroidissement et agitation un précipité blanc, cristallisé en octaèdres tronqués, et très dense, de pyroantimoniate de sodium. Le maximum de sensibilité de la réaction est obtenu quand on ajoute 10 % du réactif préparé comme ci-dessous [1] au liquide à examiner.

---

[1] Ce réactif, découvert par Frémy, s'obtenait autrefois par voie sèche ; il vaut mieux le préparer par voie humide en oxydant une

Lorsqu'il s'agit du liquide de lavage des cendres, on en prend 5 centimètres cubes auxquels on ajoute $0^{cm3},5$ de réactif; il se fait souvent un léger précipité que l'on peut alors séparer par filtration, puis on porte à l'ébullition. Si, après refroidissement, le précipité cristallin n'apparaît pas immédiatement, on peut provoquer sa formation en frottant avec un agitateur. S'il n'apparaissait pas, ce qui arrive dans les solutions étendues, on amorcerait avec un agitateur trempé dans une suspension d'antimoniate de sodium préparée en partant d'une solution diluée de chlorure ou de sulfate de sodium.

22. — Le résidu insoluble des cendres est resté sur le filtre. Celui-ci est introduit avec son contenu dans un verre à pied, et arrosé avec 20 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendu (à 10 $^0/_0$). Si le lavage à l'eau a été bien fait, le liquide doit rester for-

---

solution potassique d'hydrate antimonieux par le permanganate de potassium (Reynoso), le bichromate ou le ferrocyanure de potassium, l'eau oxygénée (Knorre et Olschewsky). D'après nos essais, il convient d'opérer de la manière suivante :

On met dans une capsule de porcelaine 25 grammes de potasse en plaques et 100 centimètres cubes d'eau ; après dissolution, on ajoute 10 grammes de trichlorure d'antimoine fondu (beurre d'antimoine), puis 88 à 90 centimètres cubes d'une solution de permanganate de potassium à 5 $^0/_0$. On fait bouillir quelques minutes, on laisse déposer un instant pour s'assurer que le liquide est incolore et on filtre. Si le liquide était coloré en vert, on ajouterait une parcelle de chlorure d'antimoine et on ferait bouillir à nouveau pour amener la décoloration.

Ainsi préparé, ce réactif donne encore un précipité abondant dans une solution qui ne renferme pas plus de 1/1.000 de sodium; dans une solution à 1/2.000, on obtient encore un précipité visible sur les parois du tube si on amorce en frottant avec un agitateur.

tement acide ; dans le cas contraire, il serait nécessaire d'ajouter une nouvelle quantité d'acide. On triture, puis on filtre à nouveau en recueillant le liquide dans un matras.

23. — *Recherche du fer et du manganèse.* On rend le liquide légèrement alcalin par l'ammoniaque ajoutée goutte à goutte : il se forme un précipité gélatineux ; on réacidifie légèrement par l'acide acétique qui redissout la majeure partie du précipité. On filtre, il reste sur le filtre un léger dépôt de phosphate de fer et de manganèse.

On caractérise le fer sur une moitié du filtre que l'on mouille avec une goutte d'acide chlorhydrique à 10 $^0/_0$, puis avec une goutte de ferrocyanure de potassium ; il se produit une coloration bleue. Sur l'autre moitié, on recherche le manganèse, après incinération, comme il est indiqué § **30** et **31**.

24. — *Recherche du calcium.* 5 à 10 centimètres cubes du liquide filtré sont portés à l'ébullition dans un petit matras et additionnés d'un volume double d'une solution saturée d'oxalate d'ammonium qui précipite le calcium à l'état d'oxalate (poudre blanche excessivement fine). On vérifie sur un petit essai filtré que la totalité de ce métal est précipitée ; s'il n'en était pas ainsi, on ajouterait un peu d'oxalate d'ammonium et on ferait bouillir à nouveau pour achever la précipitation.

25. — *Recherche combinée de l'acide phosphorique et du magnésium.* Le liquide filtré, refroidi, est fortement alcalinisé par l'ammoniaque et vivement agité ; il se

fait un précipité blanc cristallin de phosphate ammoniaco-magnésien, indiquant la présence de l'acide phosphorique et du magnésium.

Recherche de l'iode et du brome

26. — On peut trouver des quantités notables d'iode dans certains végétaux marins (varech) ou dans certains organes animaux (glande thyroïde). Il est habituellement accompagné de petites quantités de brome.

Recherche dans le varech. Pour rechercher la présence de l'iode dans le varech, on calcine au voisinage du *rouge sombre*, dans une petite capsule de nickel, 2 grammes environ de plantes desséchées. On maintient à la même température pendant quelques minutes après que la dernière incandescence a disparu, puis on laisse refroidir. On broie le charbon dans un mortier, on ajoute 5 centimètres cubes d'eau, on triture à nouveau et on jette sur un filtre. On lave avec 1 à 2 centimètres cubes d'eau.

La solution alcaline contenant l'iodure est neutralisée ou légèrement acidulée avec l'acide chlorhydrique *concentré* (en présence d'un fragment de papier de tournesol); on ajoute $0^{cm3},5$ environ de chloroforme, puis goutte par goutte, avec beaucoup de ménagement, de l'eau de chlore étendue (eau saturée étendue au cinquième), en agitant après chaque goutte. Le chlore déplace l'iode, qui se dissout dans le chloroforme en lui donnant une teinte rose violacée qui passe par un maximum, puis finit par disparaître si on ajoute un excès suffisant d'eau de chlore. La décoloration est due

à la production de chlorure d'iode incolore. Lorsqu'on opère cette décoloration avec beaucoup de soin, on observe que la teinte vire d'abord au rose, puis au jaune. Cette dernière teinte est due au brome, qui apparaît seulement lorsque l'iode est totalement combiné au chlore.

27. — *Recherche dans la glande thyroïde.* On peut rechercher l'iode dans la glande thyroïde (où il est à l'état de thyroiodine) en chauffant 2 grammes de glande fraîche avec deux à trois pastilles de potasse dans la capsule de nickel. Après fusion en une masse homogène, on calcine quelques instants à une température voisine de celle du rouge sombre, on laisse refroidir, on reprend par 5 centimètres cubes d'eau, en chauffant légèrement, et on filtre. On lave le filtre avec 1 centimètre cube d'eau et on traite la solution obtenue, qui contient l'iode à l'état d'iodure, comme précédemment.

Il importe de ne pas trop élever la température dans les calcinations, afin de ne pas perdre d'iodure par volatilisation. D'autre part, il faut chauffer assez pour ne pas laisser subsister de produits organiques qui colore raient les solutions en brun.

28. Dans la recherche de l'iode et du brome, on peut remplacer l'eau de chlore par d'autres oxydants. Avec les sels ferriques (chlorure ou alun de fer) l'iode seul est déplacé et l'on n'a pas à craindre un excès de réactif.

29. — Pour rechercher de petites quantités de brome, même en présence d'iode, on utilisera la réaction suivante (Denigès et Chelle).

A 5 centimètres cubes de la solution à étudier, on ajoute 4 gouttes d'acide chlorhydrique concentré et 1 centimètre cube d'acide sulfurique pur. On mélange, on verse 1 centimètre cube de solution de fuchsine décolorée par l'acide sulfurique [1] et 4 gouttes de solution de bichromate de potassium à 10 %.

Au liquide encore chaud, ou réchauffé vers 50°, on ajoute 1 à 2 centimètres cubes de chloroforme et on agite vivement pendant une minute. S'il y a du brome, il se forme un dérivé bromé de la fuchsine soluble dans le chloroforme et celui-ci se sépare coloré en violet rouge.

La réaction est applicable à la recherche du brome dans les eaux. Elle est encore sensible avec 1 milligramme de brome par litre.

Recherche du manganèse

30. — On peut prendre une substance végétale riche en manganèse, comme le thé. On incinère doucement un demi-gramme environ de feuilles de thé dans une petite capsule de porcelaine. Après refroidissement, on fait tomber les cendres (qui sont à peine grises ou brunâtres) dans un tube à essai, on ajoute une pincée

---

(1) Pour préparer le réactif, on verse 5 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré dans 95 centimètres cubes d'eau, on mélange, on refroidit, et on ajoute 10 centimètres cubes de solution récente de fuchsine à 0,1 %.

La solution se décolore peu à peu. Au bout d'une heure environ, elle est prête pour l'usage.

de bioxyde de plomb et 5 centimètres cubes d'acide nitrique, puis on étend de 5 centimètres cubes d'eau et on chauffe jusqu'à l'ébullition, que l'on maintient deux ou trois minutes. On laisse déposer; la coloration violette du liquide surnageant (due à l'acide permanganique) indique la présence du manganèse.

Il faut que l'incinération soit absolument complète : s'il restait une petite quantité de charbon, l'acide permanganique serait réduit au fur et à mesure, et on n'obtiendrait pas de coloration ou seulement une coloration faible plus ou moins fugace.

La présence des chlorures diminue la sensibilité de la réaction. Quand il en existe une proportion appréciable, il faut épuiser les cendres par l'eau, ajouter quelques gouttes d'alcool, chauffer un instant, filtrer et incinérer le filtre sur lequel reste la totalité du manganèse; on fait la réaction sur le résidu ainsi purifié.

31. — On peut aussi caractériser le manganèse par voie sèche, en le transformant en manganate vert.

On fait une boucle d'environ 2 à 3 millimètres de diamètre à l'extrémité d'un fil de platine ou de fer, on chauffe au rouge et on plonge aussitôt dans un mélange pulvérisé de carbonate de sodium (9 parties) et de nitrate de potassium (1 partie). La poudre adhère à la boucle et forme une perle quand on chauffe de nouveau ; celle-ci doit être blanche après refroidissement. On prélève avec la perle en fusion une petite quantité des cendres à examiner et on porte un instant dans la partie extérieure de la flamme du bec Bunsen. La masse fondue se colore en vert quand il y a du manganèse.

Recherche du fer dans le sang

32. — Le sang des vertébrés renferme des globules colorés en rouge par un pigment ferrugineux, l'hémoglobine. Il est très facile d'y mettre en évidence la présence du fer.

On verse dans une petite capsule de porcelaine une goutte de sang défibriné et on chauffe doucement. Le coagulum est incinéré avec précaution ; la cendre brun rougeâtre est dissoute ensuite dans quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré, en chauffant légèrement au besoin. On dilue avec 2 à 3 centimètres cubes d'eau, puis on ajoute quelques gouttes de ferrocyanure de potassium : un précipité bleu indique la présence du fer.

Recherche du cuivre dans le sang de l'escargot

33. — Chez certains invertébrés, mollusques et crustacés, la matière colorante du sang, de couleur bleue, renferme du cuivre au lieu de fer.

Pour déceler le cuivre dans le sang de l'escargot, on opère comme suit :

On prend un escargot vivant et on brise la coquille à une distance de son ouverture qui correspond à peu près au premier tour de spire. On élargit l'orifice de la coquille avec précaution, au moyen d'une pince, en évitant de déchirer les tissus sous-jacents, et on aperçoit bientôt le cœur de l'animal, facile à reconnaître à ses battements rythmiques. On sectionne alors le

péricarde d'un coup de ciseau et on recueille le sang, qui s'écoule aussitôt, dans un petit verre. Il est bon de forcer l'animal à rentrer dans sa coquille, au lieu de le laisser s'étendre au dehors, comme il le fait d'habitude à ce moment; la quantité de sang obtenue est plus grande. On voit ce sang, presque incolore, bleuir notablement à l'air. Lorsque la quantité n'augmente plus, on le transvase dans une petite capsule de porcelaine, on ajoute deux à trois gouttes d'acide sulfurique concentré, qui produit une coagulation, et on chauffe avec précaution. Le coagulum brunit, puis charbonne ; lorsque la carbonisation est complète, on laisse refroidir, on triture le charbon avec quelques centimètres cubes d'eau, et on jette sur un filtre ; on lave le résidu avec quelques gouttes d'eau.

Le liquide filtré contient surtout des phosphates alcalins, avec une trace de cuivre. On peut déceler celui-ci, en ajoutant au liquide, nettement alcalinisé par la soude, 1 centimètre cube de solution de formaldoxime [1]. Il se développe une coloration violette qui indique la présence du cuivre.

34. — La majeure partie de ce métal est fixée aux cendres. On introduit celles-ci, avec le filtre qui les renferme, dans la capsule de porcelaine, on sèche en chauffant doucement, puis on incinère complètement. Les cendres blanches ou grises sont, après refroidisse-

---

[1] La solution de formaldoxime s'obtient en faisant dissoudre 1 partie de chlorhydrate d'hydroxylamine cristallisé dans un mélange de 1 p. d'aldéhyde formique du commerce avec 1 p. d'eau. On chauffe doucement pour favoriser la dissolution.

ment, reprises par 5 gouttes d'acide chlorhydrique pur; la solution chlorhydrique est évaporée à sec et le résidu repris par quelques gouttes d'ammoniaque concentrée pour séparer le fer, toujours présent en petite quantité, et dont la réaction masquerait celle du cuivre. On filtre sur un très petit filtre, on lave avec un peu d'eau et on obtient une liqueur colorée en bleu pâle (bleu céleste). Ce liquide, acidifié par l'acide chlorhydrique concentré, est additionné, goutte à goutte, d'une solution de ferrocyanure de potassium; une coloration rose (ou même un léger précipité rouge) due au ferrocyanure de cuivre, indique la présence du métal cherché.

Il est indispensable d'apporter le plus grand soin à la séparation *complète* du fer; une trace de ce métal donnerait en effet une coloration bleue qui empêcherait de voir la réaction du cuivre.

Recherche du bore dans le vin

35. — Le bore est répandu en très petite quantité chez les êtres vivants. On peut le retrouver dans les cendres avec une méthode assez sensible (G. Bertrand et H. Agulhon).

La recherche est particulièrement facile dans les végétaux et surtout dans le vin.

Recherche au moyen du papier de curcuma. Évaporer à sec dans une capsule, au bain-marie, 20 centimètres cubes de vin *faiblement alcalinisé* au préalable; calciner au-dessous du rouge sombre, puis, après refroidissement, mouiller les cendres, dans les-

quelles tout le bore se trouve à l'état de borates, avec de l'acide chlorhydrique à 10 %, jusqu'à réaction légèrement acide. Jeter sur un petit filtre, recueillir le liquide dans une capsule de porcelaine de 3 centimètres de diamètre environ, et immerger dans ce liquide une petite bande de papier de curcuma [1] de 3 millimètres de largeur et d'une longueur telle (4 centimètres) que l'une des extrémités sorte du liquide et dépasse le bord de la capsule d'environ 1 centimètre. On applique la bande de papier contre la paroi interne de la capsule, l'extrémité libre passant par le bec. On recouvre avec un verre de montre et on abandonne le tout pendant quelques heures, ou même une journée. Lorsqu'il y a de l'acide borique, l'extrémité libre de la bande de papier se colore en rouge vif, virant au bleu par le contact de l'ammoniaque étendue au dixième.

36. — *Recherche à l'état de fluorure de bore.* Pour des recherches un peu plus délicates, il est préférable de séparer le bore des autres constituants des cendres, en le transformant en borate de méthyle que l'on isole par distillation. Après saponification de cet éther, on transforme l'acide borique en fluorure de bore, au moyen du fluorure de calcium et de l'acide sulfurique, et on décèle ce gaz par la coloration verte qu'il donne à la flamme incolore du bec Bunsen.

Les cendres préparées comme ci-dessus, sont placées

---

[1] On obtient celui-ci en imprégnant du papier à filtrer avec de la teinture de curcuma et faisant sécher. La teinture est préparée par ébullition de 1 partie de poudre de curcuma avec 25 parties d'alcool à 96°.

dans un petit ballon de 90 centimètres cubes avec 5 centimètres cubes d'acide phosphorique [1] et 20 centimètres cubes d'alcool méthylique pur. On adapte le ballon à un réfrigérant, au moyen d'un tube coudé, et on distille en chauffant au bain-marie. Le liquide distillé est recueilli dans un petit matras contenant *deux gouttes* de soude pure (du sodium) à 10 $^0/_0$. Il est essentiel de ne pas mettre plus de soude, afin d'éviter la dilution du borate de sodium dans un excès de substance. Lorsqu'il ne passe plus d'alcool, on ajoute au résidu resté dans le ballon 5 centimètres cubes d'alcool méthylique et on distille à nouveau.

On vérifie que le contenu du matras possède une réaction alcaline ; on chauffe alors celui-ci sur le bain-marie, au réfrigérant ascendant, pendant dix minutes, pour saponifier l'éther borique, puis on transvase le liquide dans une petite capsule et on évapore à sec au bain-marie.

Le résidu sec est trituré avec environ 2 parties de fluorure de calcium finement pulvérisé au mortier d'agate, et juste assez d'acide sulfurique pur pour former une pâte épaisse. En plaçant celle-ci sur la boucle d'un fil de platine et l'approchant avec précaution, à environ 2 millimètres de la base d'une flamme incolore de bec Bunsen, on voit se former dans la partie extérieure invisible de la flamme la coloration verte caractéristique. Il est bon de diminuer la hauteur de la flamme de façon à éviter l'entraînement trop rapide des gaz, par suite de l'appel d'air qui se produit.

---

(1) Obtenu en hydratant 1 partie d'anhydride phosphorique avec 1 partie d'eau.

En examinant au spectroscope, on aperçoit trois bandes vertes équidistantes.

Dosage de l'azote (méthode de Kjeldahl)

37. — Cette méthode repose sur la destruction de la matière organique par l'acide sulfurique concentré et bouillant, et la transformation subséquente de son azote en ammoniaque. Le dosage de l'azote est ainsi ramené à celui de l'ammoniaque.

38. — *Attaque de la substance par l'acide sulfurique.* On pèse exactement un poids de matière variable avec la richesse présumée en azote, tel qu'on ait de 20 à 40 milligrammes d'azote.

Prendre par exemple 1 à 2 grammes s'il s'agit de farine d'orge ou de malt, $0^{gr},2$ à $0^{gr},3$ s'il s'agit d'albumine ou de gélatine, etc., les verser dans un ballon à fond rond (à long col, de préférence) de 90 centimètres cubes avec 10 centimètres cubes exactement mesurés d'acide sulfurique pur et concentré et une goutte de mercure (de la grosseur d'un grain de chènevis).

Chauffer d'abord doucement, puis à l'ébullition (sur une toile métallique, en opérant dans une hotte). L'ébullition doit être réglée de telle sorte que les vapeurs d'acide sulfurique se condensent dans le col du ballon, en entraînant avec elles les parcelles de substance projetées sur les parois de celui-ci. Il faut éviter une ébullition trop vive donnant lieu à un dégagement de vapeurs acides très désagréables et ayant pour résultat une trop grande concentration du contenu du ballon.

Lorsque le liquide brun, puis jaune, s'est décoloré, éteindre le feu, et, après refroidissement partiel, ajouter de *très petites* quantités de permanganate de potassium pulvérisé, jusqu'à coloration verte ou violette persistante. Éviter un excès de permanganate.

La substance organique est détruite, le carbone passe à l'état de gaz carbonique, et l'azote à l'état d'ammoniaque qui s'unit à l'acide en excès ; il se forme un sulfate ammoniaco-mercurique qui cristallise souvent par le refroidissement en aiguilles blanches.

39. — *Distillation et titrage de l'ammoniaque.* L'appareil employé (*fig.* 3) consiste essentiellement en un ballon B muni d'un réfrigérant ascendant R roulé en spirale, refroidi simplement par l'air, qui se continue par une branche verticale descendante entourée d'un manchon M où l'on fait circuler de l'eau froide. La portion ascendante fonctionne comme séparateur ; la plus grande partie de l'eau s'y condense pour retourner dans le ballon, tandis que les vapeurs enrichies en ammoniaque passent dans la seconde portion ; le liquide résultant s'écoule par un tube effilé dans le vase où a lieu le titrage.

40. — Pour opérer la distillation, on étend d'un seul coup le liquide acide avec 60 à 80 centimètres cubes d'eau; l'élévation de température favorise la dissolution des cristaux, qui doit être complète. La solution obtenue est versée dans un ballon de 500 centimètres cubes; on rince deux à trois fois et on ajoute les eaux de lavage au liquide dans lequel il faut maintenant précipiter le mercure, sinon la combinaison mercu-

rique, difficilement attaquable par la soude, retiendrait une partie de l'ammoniaque. Pour effectuer cette précipitation, on se sert d'un réducteur énergique tel que l'hypophosphite de sodium (Maquenne). On ajoute 1

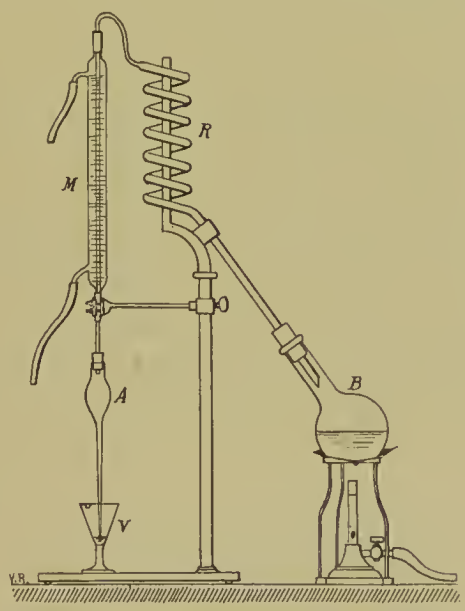


Fig. 3. — Appareil Schlœsing-Aubin.

à 2 grammes de ce sel dans le liquide encore tiède. Il se produit un précipité blanc, passant au noir (mercure métallique). Si le liquide est trop froid, cette réduction est lente à se produire, et il faut alors chauffer légèrement. On s'assure que la séparation du mercure est complète en ajoutant une pincée d'hypophosphite qui ne doit plus donner de précipité.

On verse alors assez d'eau pour amener le volume à 200 centimètres cubes environ, puis d'un seul coup,

40 centimètres cubes de lessive des savonniers à 36° B (1); on adapte aussitôt le ballon au réfrigérant et on distille. Faire plonger l'extrémité effilée de l'ampoule dans 5 centimètres cubes d'eau placée dans un verre à pied et colorée par une seule goutte d'hélianthine. Ne pas oublier de faire passer l'eau dans le réfrigérant.

Dès que le virage au jaune se produit, on verse de l'acide sulfurique titré (acide N/5, par exemple) de manière à ramener exactement au rose. Lorsque le virage ne se produit plus, toute l'ammoniaque est passée, et on peut interrompre la distillation (éviter l'absorption en détachant au préalable l'ampoule du réfrigérant).

Si l'acide sulfurique est exactement cinquième normal, chaque centimètre cube employé correspond à $0^{gr},0028$ d'azote ; pour n centimètres cubes versés, le poids de substance étant p, la teneur en azote $^0/_0$ est donnée par :

$$\frac{0,0028 \times n \times 100}{p}.$$

La méthode ainsi décrite convient au dosage de l'azote dans les substances d'origine animale ou végétale, organes, tissus, etc. Elle ne s'applique pas au dosage de l'azote nitrique (ni en présence de celui-ci) ; elle n'est pas recommandable pour des substances, comme les alcaloïdes, où l'azote est engagé dans des noyaux cycliques.

---

(1) C'est-à-dire une quantité suffisante pour rendre la réaction fortement alcaline

Préparation de l'acide sulfurique normal

41. — D'une manière générale, on désigne sous le nom d'acide normal une solution qui renferme par litre une quantité d'acide correspondant à un atome d'hydrogène remplaçable par un métal.

Si l'acide employé est monobasique (chlorhydrique, acétique, etc.), il en faut une molécule-gramme par litre. S'il est bibasique (sulfurique, oxalique, etc.), la quantité n'est plus que d'une demi-molécule-gramme par litre et ainsi de suite.

De même, on appelle solution alcaline normale une solution dont la concentration est telle qu'elle sature son volume de solution acide normale.

42. — Pour préparer une solution normale d'acide, la méthode la plus simple et la plus pratique consiste à distiller un poids exactement déterminé d'un sel ammoniacal convenablement choisi, en présence d'un excès de soude, dans l'appareil décrit au § **39**, et à calculer le titre de l'acide d'après la quantité de ce dernier qui est employée à la saturation de l'ammoniaque dégagée. Le sel qui convient le mieux est l'oxalate $C^2O^4(NH^4)^2 + H^2O$, parce qu'il est facile de l'obtenir pur, et qu'il n'est ni efflorescent ni déliquescent.

43. — Le mode opératoire est le suivant. On pèse $0^{gr},710$ de sel, que l'on introduit dans le ballon avec 150 centimètres cubes d'eau et quelques centimètres cubes de lessive de soude. On distille en recueillant

dans une petite quantité d'eau (4 à 5 centimètres cubes) très légèrement colorée par une goutte d'hélianthine. Il faut éviter un excès d'indicateur qui exigerait pour virer une quantité non négligeable d'acide ou d'ammoniaque et diminuerait par conséquent la sensibilité du virage.

Aussitôt que l'ammoniaque distille, le liquide devient jaune ; on le ramène à la teinte rose primitive en y versant l'acide à titrer contenu dans une burette graduée [1]. Chaque fois que la teinte jaune réapparaît on ajoute un peu d'acide ; vers la fin de l'opération, lorsqu'il ne reste plus que très peu d'ammoniaque à distiller, il faut avoir soin de verser l'acide goutte à goutte pour ne pas risquer d'en mettre en excès. Le dosage est terminé lorsque la teinte rose ne varie plus. La quantité d'oxalate d'ammonium employée correspond exactement à 10 centimètres cubes d'acide normal ; par conséquent, si on a versé n centimètres cubes de l'acide à titrer, il est évident que ces n centimètres

---

[1] L'acide à titrer se prépare en versant 52 à 53 grammes d'acide sulfurique concentré à 66° B. (au lieu de 49 grammes, représentant la quantité théorique), dans 700 à 800 centimètres cubes d'eau environ. On doit placer l'eau dans un ballon et y verser peu à peu l'acide en agitant ; on refroidit ensuite et on complète le volume à 1 litre. En opérant ainsi, non seulement on tient compte de la petite quantité d'eau que renferme l'acide du commerce, mais de plus on obtient un liquide un peu plus concentré que l'acide normal, ce qui permet une correction facile par dilution ultérieure.

Si on ne veut pas peser l'acide, on peut en mesurer 30 centimètres cubes (au moyen d'une pipette, par exemple), et amener le volume total à 1.050 centimètres cubes. Si on pèse ou si on mesure l'acide dans un vase, gradué ou non, ne pas oublier de le rincer avec un peu d'eau que l'on ajoute à la solution acide afin d'éviter une perte très importante.

cubes doivent être étendus à 10 centimètres cubes si on veut rendre la liqueur exactement normale. Un volume v du liquide acide devra être additionné d'une quantité d'eau égale à $\frac{v}{n}(10 - n)$.

44. — L'acide sulfurique normal s'emploie d'une manière générale pour le titrage des solutions à réaction alcaline ; on se souviendra que 1 litre d'acide sulfurique normal, étant préparé avec un acide bibasique SO^4H^2, renferme une demi-molécule-gramme (49 gr.) de ce corps, correspondant à un seul atome d'hydrogène acide. Cette quantité est donc susceptible de neutraliser soit une molécule-gramme d'un alcali monovalent tel que la potasse, la soude, l'ammoniaque, soit une demi-molécule-gramme d'un corps bivalent, comme la chaux, la baryte, le carbonate de potassium, etc. Il s'ensuit que si on dissout une molécule-gramme d'un alcali monovalent (ou une demi-molécule pour un corps divalent) dans 1 litre d'eau, ces solutions correspondront à l'acide sulfurique normal volume à volume. Autrement dit, pour se placer au point de vue pratique, 1 centimètre cube d'acide sulfurique normal, correspondant à $0^{gr},049$ de SO^4H^2, correspond aussi à :

$0^{gr},056$ de KOH,	$0^{gr},040$ de NaOH
0 ,017 de NH^3,	0 ,028 de CaO
0 ,0765 de BaO,	0 ,069 de CO^3K^2, etc.

Dans le calcul d'un dosage, on multipliera simplement le nombre de centimètres cubes d'acide employés dans la saturation par le nombre correspondant à cha-

cun des corps dosés, sans faire intervenir l'équation particulière à chaque réaction. Si, par exemple, pour saturer un volume donné de soude caustique, on emploie n centimètres cubes d'acide normal, la quantité de soude contenue dans ce volume sera de :

$$n \times 0{,}040 \text{ grammes.}$$

Dosage de l'alcalinité des cendres

45. — On pèse 5 grammes de sciure de bois que l'on incinère lentement, au four à moufle, en ayant soin de ne pas dépasser le rouge sombre. Lorsque les cendres obtenues sont presque blanches, on laisse refroidir, puis on les fait tomber dans un matras, et on les délaie dans 5 à 10 centimètres cubes d'eau. On ajoute alors une goutte d'hélianthine, puis de l'acide chlorhydrique décime en léger excès, de manière à avoir une teinte rose persistante (15 à 20 centimètres cubes). On chauffe légèrement en agitant, pour faciliter la réaction, puis on verse de la soude décime de façon à revenir à la teinte jaune. La quantité d'acide versée, diminuée de cette quantité de soude, correspond à l'alcalinité des cendres. On peut l'exprimer en carbonate de potassium, par exemple.

Si les cendres renfermaient encore du charbon en quantité notable, l'hélianthine serait absorbée par ce charbon et le liquide se décolorerait, ce qui rendrait le virage difficile ou même impossible.

Dosage colorimétrique du manganèse

46. — Le dosage du manganèse peut être fait par colorimétrie lorsqu'on l'a transformé en acide permanganique par oxydation. On doit, pour faire le dosage, partir des cendres convenablement préparées.

Préparation des cendres. Les tissus ou extraits desséchés sont incinérés à la température du rouge sombre, jusqu'à disparition du résidu charbonneux. On laisse refroidir, on ajoute un léger excès d'acide chlorhydrique concentré, puis on chauffe au bain-marie. Quand le liquide se décolore, on ajoute un peu d'acide sulfurique étendu pour décomposer les chlorures, puis on évapore et on calcine de nouveau, sans dépasser le rouge sombre. Si on avait chauffé un peu trop fort, il faudrait mouiller le résidu avec une goutte d'acide chlorhydrique, chauffer une ou deux minutes, ajouter un peu d'acide sulfurique dilué, et évaporer jusqu'à apparition de fumées blanches.

47. — *Oxydation du manganèse.* Les cendres sont placées dans un tube à essai qui porte un trait de jauge correspondant au volume de 10 centimètres cubes, et dissoutes dans 2 à 3 centimètres cubes d'acide nitrique au quart (acide à 36° B. étendu de 3 volumes d'eau). On ajoute 2 à 5 gouttes de solution de nitrate d'argent à 10 $^0/_0$, $0^{gr},2$ à $0^{gr}3$ de persulfate de potassium en poudre fine, on complète à 10 centimètres cubes avec l'acide nitrique au quart, et on chauffe doucement. Il apparaît peu à peu une teinte rose ou violette, suivant la quantité de manganèse ; on

porte graduellement à l'ébullition pour décomposer l'excès de persulfate, et on s'arrête quand le dégagement d'oxygène a cessé; on couvre alors le tube et on le laisse refroidir.

48. — *Dosage colorimétrique.* On prépare d'abord une solution contenant $4^{gr},054$ de sulfate de manganèse à $4H^2O$, bien cristallisé et non effleuri, dans 1 litre d'eau. On dilue cette solution (qui renferme 1 milligramme de manganèse par centimètre cube) au 1/100 (10 centimètres cubes dans une fiole jaugée de 1 litre), puis on place dans une série de tubes à essai préalablement bien nettoyés en y faisant bouillir un peu d'acide nitrique et lavant à l'eau distillée, des quantités exactement mesurées de la dilution. Soit, par exemple : 5^{cm3}; 2^{cm3}; 1^{cm3}; $0^{cm3},5$; $0^{cm3},2$; $0^{cm3},1$ donnant, après dilution à 10 centimètres cubes, des quantités de manganèse respectivement égales à 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 de milligramme. On oxyde par le persulfate comme plus haut, et on a une gamme colorée à laquelle on peut comparer le tube contenant le manganèse à doser.

En multipliant les essais comparatifs, on peut pousser plus loin l'approximation.

Dosage du fer dans le sang

49. — On peut facilement doser le fer, ramené préalablement à l'état de sel ferreux, au moyen d'une solution titrée de permanganate de potassium.

Pour doser le fer contenu dans le sang, on verse

3 à 5 centimètres cubes de celui-ci dans une capsule de porcelaine tarée et on pèse exactement. On chauffe; le sang coagule et le caillot, séché doucement, est incinéré avec précaution, à cause du boursouflement qui se produit au début. On termine la combustion du charbon en projetant dans la capsule quelques cristaux de nitrate d'ammonium, et on reprend les cendres par quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. On évapore à sec, on décompose les chlorures au moyen de quelques gouttes d'acide sulfurique, et on chauffe jusqu'à dégagement de fumées blanches. On recommence encore une fois le traitement par l'acide sulfurique concentré, puis on redissout dans quelques centimètres cubes d'acide sulfurique à 10 $^0/_0$, on verse la solution dans un matras et on ajoute un gros grain de zinc fondu, ou une lame de zinc pas trop mince bien décapée. Le matras est fermé avec un bouchon muni d'un tube effilé.

L'hydrogène qui se dégage réduit le sel ferrique en sel ferreux; après 15 à 20 minutes, la réduction est terminée et le liquide est devenu clair.

On décante alors dans une fiole conique et on lave trois fois avec un peu d'eau bouillie, en évitant d'entraîner une seule parcelle de zinc. On titre finalement au moyen d'une solution de permanganate de potassium à $0^{gr},5$ par litre, que l'on verse jusqu'à coloration rose persistante.

La solution de permanganate peut être titrée facilement au moyen de l'alun de fer ammoniacal, de formule $(SO^4)^3\ Fe^2 + SO^4\ (NH^4)^2 + 24H^2O$. On pèse exactement $8^{gr},60$ de ce sel, que l'on introduit dans une fiole jaugée de 1 litre; on dissout dans un peu d'eau,

additionnée de quelques gouttes d'acide sulfurique, on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau et on mélange bien. Pour effectuer le titrage, on mesure avec une pipette 10 centimètres cubes de cette solution (qui renferme 1 milligramme de fer par centimètre cube), on les introduit dans un matras avec 1 centimètre cube d'acide sulfurique et un fragment de grenaille de zinc, et on opère comme ci-dessus.

CHAPITRE II

PRINCIPES IMMÉDIATS INCOMBUSTIBLES

Recherche des nitrates

50. — Les nitrates se forment surtout dans le sol par fermentation ; ils passent de là dans les végétaux par les racines, dans les rivières par les eaux de pluie qui drainent le sol.

Recherche des nitrates dans le sol et dans les eaux. Pour rechercher les nitrates dans le sol, on délaie 10 grammes de terre dans 10 centimètres cubes d'eau distillée, on jette sur un filtre et on évapore à sec la petite quantité de liquide filtré, dans une capsule, au bain-marie.

Pour déceler la présence des nitrates dans les eaux naturelles, on évapore à sec 1 à 10 centimètres cubes de ces eaux, comme pour l'eau de lavage de la terre. Dans l'un ou l'autre cas, on effectue les réactions sur le résidu obtenu.

51. — Après refroidissement complet, on délaie ce résidu dans quelques gouttes d'acide sulfurique pur, puis on ajoute quelques milligrammes de sulfate

ferreux pulvérisé (un petit cristal écrasé entre deux feuilles de papier). En remuant le mélange avec un agitateur, on voit apparaître une coloration rose. Celle-ci est due à la réduction de l'acide nitrique en bioxyde d'azote sous l'action du sulfate ferreux et à la production d'une combinaison fortement colorée de ce gaz avec l'excès de sulfate ferreux.

52. — Au lieu de cette réaction caractéristique, on emploie souvent la suivante : on fait couler sur le résidu de l'évaporation une goutte de réactif à la diphénylamine [1]; il se produit une coloration bleu foncé en présence de nitrates (les nitrites donnent aussi cette réaction).

53. — On peut aussi déceler la présence d'un nitrate dans le résidu de l'évaporation en le délayant dans une à deux gouttes d'acide sulfurique concentré, puis ajoutant quelques milligrammes de brucine ; il se produit une coloration rouge, virant à l'orangé, puis au jaune.

54. — *Recherches des nitrates dans les plantes.* La recherche réussit très facilement avec la plupart des plantes fraîches, pourvu que l'on opère presque aussitôt après la récolte. On broie au mortier une petite quantité de végétal (luzerne, trèfle, ortie, etc.), et on recueille avec l'extrémité d'un agitateur une goutte-

---

(1) Le réactif se prépare en mélangeant 100 centimètres cubes d'acide sulfurique pur, 5 centimètres cubes de solution de sulfate de diphénylamine à 5 %, et 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 10 %.

lette du jus, sur lequel on effectue les réactions précédemment indiquées.

On peut même se contenter le plus souvent de frotter l'intérieur d'une capsule de porcelaine avec la section fraîche d'une tige et d'essayer directement sur l'endroit mouillé la réaction colorante.

Recherche des nitrites

55. — On peut déceler les nitrites dans le sol ou dans les eaux par l'une des réactions suivantes :

On fait un empois en chauffant à l'ébullition dans un tube à essai une petite quantité de fécule (une tête d'épingle) avec 6 à 8 centimètres cubes d'eau ; après refroidissement, on ajoute 1 centimètre cube de solution fraîchement préparée d'iodure de potassium ou un petit cristal de ce sel et on acidule avec quelques gouttes d'acide acétique.

Le liquide doit rester incolore (il bleuirait si l'on employait une solution ancienne d'iodure, colorée en jaune par de l'iode libre). Si on ajoute une goutte de solution très étendue d'un nitrite (eau de lavage du sol ou eau naturelle, préalablement concentrée au bain-marie), il se produit une coloration bleue intense due à l'iodure d'amidon qui se forme lorsque l'iode est mis en liberté par l'acide nitreux.

56. — On introduit dans un tube 5 centimètres cubes de solution de β-naphtylamine à 1 $^0/_0$ (filtrée et acidifiée par 10 $^0/_0$ d'acide acétique) et 5 centimètres cubes de solution d'acide sulfanilique à 1 $^0/_0$; il ne se

produit aucune coloration. En présence d'une trace de nitrite, on a une coloration rose (Griess).

L'acide nitreux, déplacé par l'acide acétique, réagit sur l'acide sulfanilique pour donner un diazoïque; celui-ci se combine à la naphtylamine avec production d'une matière colorante rouge, suivant l'équation :

$$C^6H^4\left\langle\begin{matrix}SO^3H\\N{=}N.OH\end{matrix}\right. + C^{10}H^7.NH^2 = H^2O + C^6H^4\left\langle\begin{matrix}SO^3H\\N{=}N.C^{10}H^6.NH^2\end{matrix}\right.$$

Cette deuxième réaction est spécifique ; la première se produit avec la plupart des substances oxydantes.

Recherche des sulfocyanates

57. — Les sulfocyanates existent souvent en petite quantité dans la salive, le suc gastrique et l'urine. On peut les déceler directement dans la salive par les réactions suivantes :

Quelques centimètres cubes de ce liquide sont acidifiés nettement avec l'acide chlorhydrique étendu, puis additionnés goutte à goutte, avec précaution, d'une solution très diluée de chlorure ferrique ; une coloration orangée ou rouge décèle la présence des sulfocyanates.

58. — On prépare dans un tube à essai un empois d'amidon avec une trace de fécule délayée dans 5 centimètres cubes d'eau portée à l'ébullition, et on y dissout une petite quantité d'iodate de potassium (environ deux têtes d'épingle). On acidule avec un peu d'acide chlorhydrique étendu; le liquide doit rester incolore.

Si on ajoute peu à peu à ce réactif quelques centimètres cubes de salive, on obtient une coloration bleue due à l'iodure d'amidon : l'acide sulfocyanique réagit en effet sur l'acide iodique en mettant de l'iode en liberté.

Dosage de l'eau

59. — Les substances d'origine animale ou végétale contiennent des proportions d'eau souvent très élevées. Pour doser celles-ci, on pèse exactement une certaine quantité de matière, on la dessèche, et on pèse à nouveau. La perte de poids, ramenée à 100 parties de substance, donne la teneur en eau ou humidité $^0/_0$; on a :

$$h = \frac{P - p}{P} \times 100,$$

en appelant P et p les poids obtenus avant et après dessiccation.

A cause de l'altérabilité des substances d'origine animale ou végétale sous l'influence de la chaleur, on ne doit pas dépasser 120°. On introduit la matière dans un petit flacon très léger ; celui-ci est placé dans une étuve réglée à 100°, par exemple ; après quelques heures, on retire le flacon de l'étuve, on le bouche, on le laisse refroidir, puis on pèse en prenant comme tare un flacon semblable. Le flacon avec son contenu est replacé à l'étuve pendant une ou deux heures, puis pesé à nouveau dans les mêmes conditions. Si le poids n'a pas varié depuis la pesée précédente, la substance est sèche ; sinon on la replace à l'étuve pendant le même

temps, et ainsi de suite jusqu'à ce que deux pesées successives coïncident. C'est ce que l'on appelle la dessiccation jusqu'à poids constant.

Au lieu d'un flacon bouché en verre mince, on peut se servir d'une nacelle qu'on enferme alors, au sortir de l'étuve, dans un tube bouché, du modèle dit pèse-filtre. Dans ce cas, on fait la tare avec un second tube.

On peut laisser refroidir et conserver les flacons ou les tubes bouchés côte à côte dans la salle de balances et non dans un dessiccateur.

60. — Avec certaines substances, en particulier les substances amylacées, il se produit un équilibre avec l'atmosphère environnante, de sorte que la dessiccation est fonction de l'état hygrométrique de cette atmosphère. Autrement dit la dessiccation reste relative, elle n'est jamais complète (Maquenne). Il est alors nécessaire d'opérer dans un courant de gaz sec (air, hydrogène ou anhydride carbonique).

On met la substance dans une nacelle et on glisse celle-ci dans un gros tube horizontal logé dans une étuve de forme appropriée. On fait arriver le gaz, desséché au moyen d'un barbotage dans l'acide sulfurique concentré, en réglant la vitesse du courant gazeux de manière à en faire passer 1 litre à l'heure environ. Dans ces conditions, la dessiccation est absolue après une heure à 120° ou deux heures à 100°. On retire la nacelle, pourvue d'un petit anneau à l'une de ses extrémités, à l'aide d'un crochet en fil métallique, et on l'introduit dans un pèse-filtre pour la pesée. On doit, comme ci-dessus, opérer la dessiccation jusqu'à poids constant.

Incinération

61. — Les substances d'origine animale ou végétale soumises à l'incinération laissent un résidu de matières minérales qui constituent ce que l'on appelle les *cendres*. Ces cendres, de composition très complexe, renferment généralement des quantités notables de sels alcalins plus ou moins fusibles (chlorures, phosphates). Si on chauffe trop fortement, ces sels fondent pendant la calcination, englobent le charbon et le protègent du contact de l'oxygène. D'autre part, quelques-uns de ces sels (chlorures, bromures, iodures) sont notablement volatils, tout au moins à partir du rouge. Pour ces diverses raisons, il faut opérer la calcination à la plus basse température possible ; pratiquement on ne doit pas dépasser le rouge sombre. Dans ces conditions, la disparition du charbon qui provient de la décomposition de la matière organique a lieu avec le maximum de vitesse, et c'est seulement dans le cas où la matière est exceptionnellement riche en sels alcalins qu'il peut y avoir quelques difficultés à l'obtenir d'une manière totale par un chauffage direct. Dans de tels cas, au lieu de maintenir indéfiniment le résidu de la calcination à une température qui pourrait faire craindre des pertes de la matière minérale, il faut, dès que la carbonisation de la matière organique est totale, ou tout au moins quand la disparition du charbon cesse d'être apparente, laisser refroidir, puis traiter le résidu par un peu d'eau. Les sels alcalins qui englobaient le charbon se dissolvent ; on décante le liquide sur un petit filtre, en recueillant la solution dans un verre à pied. On lave

le résidu insoluble avec un peu d'eau, de façon à le débarrasser entièrement des sels solubles; on constate que ce résultat est atteint lorsqu'une goutte du liquide filtré, évaporée avec précaution au bain-marie, ne laisse plus de résidu (comparer avec l'évaporation de l'eau distillée). On place le filtre et son contenu dans la capsule, sur le résidu charbonné, on dessèche doucement, et on incinère de nouveau. On n'a plus à craindre, cette fois, ni la fusion ni la volatilisation des sels alcalins, et on peut chauffer franchement au rouge. Le charbon disparaît très rapidement, laissant un résidu formé par les sels insolubles.

Si l'on veut doser les cendres, on verse dans la capsule le liquide de lavage et on évapore à sec au bain-marie ; on termine par un court chauffage au rouge sombre, on laisse refroidir et on pèse.

Pour les incinérations, on pourra se servir d'un bec de gaz, d'une lampe à alcool ou d'un four à moufle. L'emploi du bec de gaz est très simple, mais il a l'inconvénient, en raison des composés sulfurés contenus dans le gaz, d'introduire de petites quantités d'acide sulfurique dans les cendres ; il peut même, lorsqu'il est en cuivre, et ceci s'applique dans le cas des fours à moufle ordinaires, introduire des traces de cuivre dans le résidu minéral. Dans le cas de la recherche ou du dosage exacts du soufre, le choix de la lampe à alcool est tout indiqué ; dans la recherche de traces de cuivre dans les organes, le mieux est d'employer un four à moufle chauffé au charbon de bois.

On se sert habituellement de capsules en platine pour obtenir les cendres ; on peut aussi se servir de capsules en porcelaine, à la condition expresse d'opérer,

comme il est dit plus haut, à une température insuffisante pour amener la fusion des sels alcalins. Si l'on chauffait trop fort, il pourrait y avoir réaction entre ceux-ci et les silicates qui constituent la couverte de la capsule.

Dosage des chlorures dans l'urine

62. — On met 5 centimètres cubes d'urine dans une petite capsule de porcelaine ou de nickel, on ajoute quelques décigrammes de carbonate de sodium pur, et on évapore à sec sur une petite flamme, sans aller à l'ébullition. On incinère en évitant les projections et sans dépasser la température du rouge sombre, afin de ne pas volatiliser les chlorures. Quand la matière organique est complètement charbonnée, on laisse refroidir et on verse sur le résidu 5 à 10 centimètres cubes d'eau chaude. On triture avec un agitateur et on laisse déposer un instant. Le liquide surnageant doit être incolore; s'il est coloré en jaune, c'est que la carbonisation est incomplète, et il faut de nouveau évaporer à sec et chauffer au rouge sombre.

Le liquide incolore est passé à travers un filtre sans plis. On lave à l'eau chaude le résidu insoluble et le filtre de manière à rassembler dans le liquide filtré la totalité des chlorures.

63. — *Dosage des chlorures par la méthode de Mohr.* On neutralise très exactement avec de l'acide nitrique étendu, versé goutte à goutte ; si on a légèrement dépassé la neutralité, on ajoute au mélange une petite

pincée de carbonate de calcium pur. On verse maintenant trois à quatre gouttes d'une solution de chromate neutre de potassium à 10 %, puis une solution décinormale de nitrate d'argent [1] contenue dans une burette, en agitant sans cesse. On s'arrête aussitôt qu'il se produit une faible coloration rouge persistante. Cette teinte est due à la formation de chromate d'argent, qui n'apparaît que lorsque tout le chlore est passé à l'état de chlorure d'argent.

D'après l'équation :

$$\underset{170}{AgNO^3} + \underset{58,5}{NaCl} = \underset{143,5}{AgCl} + \underset{85}{NaNO^3}$$

chaque centimètre cube de solution d'argent correspond à $3^{mgr},55$ de chlore ou à $5^{mgr},85$ de chlorure de sodium.

On peut éviter les calculs en prenant une solution d'argent telle que chaque centimètre cube corresponde à 1 gramme de chlorure de sodium par litre d'urine (soit à $14^{gr},530$ de nitrate d'argent par litre).

Cette méthode peut être appliquée directement à l'urine, sans incinération préalable, mais elle donne alors des résultats très peu exacts, et il est préférable, si l'on ne veut pas passer par les cendres, d'employer le procédé suivant.

---

(1) Cette solution se prépare en faisant dissoudre du nitrate d'argent dans la proportion de 17 grammes par litre. Il faut prendre du nitrate cristallisé bien exempt d'acide en excès, ou mieux le sel fondu dans une petite capsule de porcelaine, à température assez basse pour éviter sa décomposition. Celle-ci se manifesterait par une coloration noire due à l'argent.

64. — *Dosage des chlorures par la méthode de Volhardt.* On prend 10 centimètres cubes d'urine que l'on introduit dans une fiole jaugée de 100 centimètres cubes avec assez d'acide nitrique pour rendre la réaction franchement acide au tournesol (1 à 2 centimètres cubes) ; on ajoute peu à peu, par portions de 5 centimètres cubes, une solution décinormale de nitrate d'argent, jusqu'à ce que celle-ci soit en excès. Après chaque addition, il faut agiter vivement le mélange, de manière à rassembler le mieux possible le précipité de chlorure d'argent. Tant que le liquide renferme des chlorures en solution, il s'éclaircit d'une manière incomplète ; au contraire, dès que l'argent domine, on obtient par agitation un précipité caillebotté dans un liquide presque limpide. On complète alors à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée, on agite et on filtre.

Il faut maintenant titrer l'excès d'argent contenu dans le liquide. On verse 50 centimètres cubes de celui-ci, mesurés avec une pipette, dans un verre à pied ; on y ajoute 2 à 3 centimètres cubes d'une solution de sulfate ferrique (ou d'alun de fer) à 5 $^0/_0$, puis goutte à goutte, au moyen d'une burette, une solution décinormale de sulfocyanate de potassium [1]. Il se précipite d'abord du sulfocyanate d'argent blanc ; puis, dès que tout l'argent est précipité, apparaît la coloration rose due à la présence du sel ferrique. On s'arrête à ce virage. La quantité de sulfocyanate employée, multi-

---

[1] Pour préparer cette solution, on fait dissoudre 10 à 12 grammes de sulfocyanate de potassium dans 1 litre d'eau. La solution, rendue homogène par agitation, est versée goutte à goutte, au moyen d'une burette, dans 10 centimètres cubes de nitrate d'argent déci-

pliée par 2, indique la quantité de solution décime d'argent employée en excès dans la précipitation des chlorures contenus dans 10 centimètres cubes d'urine.

Soit V centimètres cubes la quantité de nitrate d'argent décime employée, et n la quantité de sulfocyanate correspondant à l'excès d'argent ; on aura la teneur x de l'urine en grammes de chlorure de sodium par litre au moyen de la formule suivante :

$$x = (V - 2n) \times 0{,}00585 \times 100.$$

65. — *Dosage pondéral des chlorures.* Ce dosage est basé sur la précipitation du chlore à l'état de chlorure d'argent, qui est lavé, séché et pesé.

Les cendres de 10 centimètres cubes d'urine sont préparées et épuisées par l'eau comme il est indiqué au § **62.** L'épuisement doit être continué jusqu'à ce qu'une goutte du liquide filtré, recueillie sur un verre de montre, ne donne aucun louche en présence du nitrate d'argent.

Le liquide filtré, recueilli dans une fiole conique, est acidifié avec 1 à 2 centimètres cubes d'acide nitrique, puis additionné d'une solution de nitrate d'argent à 10 $^0/_0$, goutte à goutte, en agitant le mélange tant qu'il

---

normal, additionnés de 20 centimètres cubes d'eau, 2 à 3 centimètres cubes de la solution ferrique et 10 gouttes d'acide nitrique. On agite et on note le volume v nécessaire pour produire une coloration rougeâtre et persistante du liquide.

Pour rendre la solution de sulfocyanate exactement décinormale, il faut ajouter à 1 litre de cette solution un volume d'eau égal à

$$\left(\frac{10 - v}{v}\right) \times 1000.$$

se fait un précipité. Celui-ci se rassemble aisément dès que l'argent est en excès.

On chauffe au bain-marie pendant quelques minutes jusqu'à ce que le dépôt se soit bien rassemblé, et on décante le liquide sur un filtre à analyse, préalablement mouillé et bien appliqué dans un entonnoir dont l'angle doit être exactement de 60°. Le précipité resté dans la fiole est délayé dans un peu d'eau chaude aiguisée d'une goutte d'acide nitrique ; après repos, on décante sur le filtre, on recommence deux à trois fois le lavage par décantation, puis on fait tomber la totalité du précipité sur le filtre, en s'aidant d'un jet de pissette. On lave encore à l'eau chaude, jusqu'à ce que le liquide filtré ne se trouble plus par l'acide chlorhydrique, et on laisse égoutter. L'entonnoir est alors séché avec son contenu dans l'étuve à 100°-110°.

Le filtre, détaché de l'entonnoir, est placé, la pointe en haut, sur une feuille de papier glacé (noir de préférence). En pressant légèrement, on détache le précipité du filtre ; ce dernier est alors plié et introduit dans une petite capsule de porcelaine tarée, tandis que le précipité resté sur la feuille de papier est recouvert d'un grand entonnoir, pour éviter des pertes.

La capsule est chauffée doucement pour carboniser le filtre, puis ensuite plus fortement pour brûler le papier. On laisse refroidir, on mouille les cendres avec une goutte d'acide nitrique, on évapore doucement à sec, on reprend par une goutte d'acide chlorhydrique et on évapore de nouveau. On a ainsi transformé en chlorure les parcelles d'argent réduit qui auraient pu se former pendant l'incinération sous l'action du charbon.

Le précipité est alors introduit dans la capsule et celle-ci est chauffée jusqu'à ce que le chlorure d'argent commence à fondre sur les bords. On laisse refroidir dans l'exsiccateur et on pèse.

Le poids de chlorure d'argent, multiplié par 0,4077, donne la quantité de chlorure de sodium contenu dans 10 centimètres cubes d'urine.

Manière d'être de l'acide phosphorique et des phosphates en présence des divers indicateurs

66. — L'acide phosphorique $PO(OH)^3$ est un acide tribasique dans lequel les fonctions acides réagissent d'une manière différente sur les indicateurs colorés. La première, comparable comme énergie à celle de l'acide sulfurique ou chlorhydrique, agit sur tous les indicateurs, tournesol, hélianthine et phtaléine. Lorsque cette fonction est saturée, la seconde apparaît comme celle d'un acide faible tel que l'acide carbonique; elle agit nettement sur la phtaléine, d'une manière encore apparente sur le tournesol, mais plus du tout sur l'hélianthine. Quant à la troisième fonction, elle est si faible qu'elle ne peut déplacer les matières colorantes indiquées ci-dessus, lorsqu'elles sont à l'état de sels alcalins.

On peut se baser sur ces caractères pour reconnaître si, dans une solution, l'acide phosphorique est libre ou plus ou moins saturé. On peut aussi les appliquer au dosage de cet acide ou de ses sels de sodium, de potassium ou d'ammonium.

67. — On placera dans trois verres 10 centimètres cubes d'une solution d'acide phosphorique contenant une molécule-gramme par litre (98 grammes ou, pratiquement, 158 grammes d'acide du commerce à 45°B.), on ajoutera une goutte d'orangé III (ou hélianthine) dans le premier verre, 4 à 5 gouttes de teinture de tournesol dans le second et une goutte de solution alcoolique de phtaléine dans le troisième, puis on versera dans chacun des verres de la soude normale, en agitant, jusqu'à virage persistant.

En présence d'orangé, le virage du rouge au jaune a lieu lorsqu'on a versé 10 centimètres cubes; il correspond à la transformation complète de l'acide en phosphate monosodique PO^4NaH^2 ou plus exactement à l'addition d'une trace d'alcali en excès sur la quantité nécessaire pour produire cette combinaison. En présence de phtaléine, la teinte rose apparaît quand on a versé un volume double, soit 20 centimètres cubes [1] ; ce virage correspond à la formation du phosphate bisodique PO^4Na^2H. En présence de tournesol, on observe une teinte violet rouge lorsqu'on a versé 9 à 10 centimètres cubes de soude; le violet rouge vire de plus en plus au violet bleu, pour devenir franchement bleu lorsqu'on a versé 20 à 22 centimètres cubes. En raison du manque de précision qu'il comporte, ce dernier indicateur doit donc toujours être exclu lorsqu'on fait un titrage en présence de phosphates.

---

[1] Ceci n'est absolument exact qu'à la condition de pousser le virage au rose très net.

On peut reconnaître si l'on a affaire à l'acide phosphorique libre ou aux divers phosphates des métaux alcalins à l'aide du tableau suivant, qui résume en quelque sorte les résultats trouvés ci-dessus :

	Orangé	Tournesol	Phtaléine
Acide phosphorique libre...	acide	acide	acide
Phosphate monométallique.	**neutre**	acide	acide
— bimétallique....	alcalin	alcalin	**neutre** [1]
— trimétallique....	alcalin	alcalin	alcalin

Les phosphates alcalino-terreux mono et bimétalliques sont acides tous deux vis-à-vis des trois indicateurs, tandis que les trimétalliques sont neutres.

Titrage de l'acide phosphorique et des phosphates alcalins

68. — L'acide phosphorique et les phosphates alcalins peuvent se trouver mélangés dans une solution ; mais on doit remarquer que, par suite de leurs transformations réciproques sous l'influence de l'acidité ou de l'alcalinité, seuls peuvent exister (dans le cas du sodium, par exemple) les mélanges suivants :

$$PO^4H^3 + PO^4NaH^2$$
$$PO^4NaH^2 + PO^4Na^2H$$
$$PO^4Na^2H + PO^4Na^3$$

---

(1) En réalité, les phosphates bimétalliques sont un peu alcalins à la phénolphtaléine.

un mélange fait d'une manière différente se transformant immédiatement en l'un de ceux-ci. Il est facile de voir, par l'emploi combiné des deux indicateurs colorés, orangé et phtaléine, à quel cas on a affaire, comme le montre le tableau suivant, dans lequel Na peut être remplacé, en totalité ou en partie, par K ou NH^4 :

	Orangé	Phtaléine
$PO^4H^3 + PO^4NaH^2$...	acide (rouge)	acide (incolore)
$PO^4NaH^2 + PO^4Na^2H$.	alcalin (jaune)	acide
$PO^4Na^2H + PO^4Na^3$..	alcalin	alcalin (rose)

69. — 1° Le liquide est acide aux deux indicateurs. On peut avoir affaire à l'acide phosphorique seul ou au premier mélange. On ajoutera à 10 centimètres cubes du liquide une goutte d'orangé, puis de la soude (N/10 par exemple) jusqu'à virage du rouge au jaune (soit x centimètres cubes). On a ainsi transformé l'acide en phosphate monosodique.

D'autre part, à 10 centimètres cubes de liquide primitif, on ajoute une goutte de phtaléine, puis de la soude N/10 jusqu'à virage au rose vif (soit y centimètres cubes). On a ainsi transformé le tout en phosphate disodique.

Si on a $y = 2x$, c'est qu'il s'agit d'acide phosphorique seul, car il faut évidemment, dans ce cas, deux fois plus de soude pour avoir PO^4Na^2H que pour obtenir PO^4NaH^2.

Mais, si $y > 2$, on a le mélange $PO^4H^3 + PO^4NaH^2$; dans ce cas, x représente la soude nécessaire pour amener PO^4H^3 à l'état de PO^4NaH^2 ; autrement dit x me-

sure l'acide phosphorique présent, qui est donné, en grammes par litre, par :

$$x \times 0{,}0098 \times 100\ (^1).$$

Il est manifeste que $2x$ représente la soude nécessaire pour amener ce même acide phosphorique à l'état de PO^4NaH^2 et par conséquent $y - 2x$ est la quantité de soude nécessaire pour amener PO^4NaH^2 déjà présent à l'état de PO^4Na^2H. Autrement dit $y - 2x$ représente le phosphate monosodique, qui est donné, en grammes par litre, par :

$$(y - 2x) \times 0{,}012 \times 100.$$

Si l'acidité du liquide vis-à-vis de l'orangé disparaissait par une seule goutte de soude décime ajoutée, on aurait seulement du phosphate monosodique, que l'on titrerait de même par la soude en présence de phtaléine.

70. — 2° Le liquide, alcalin vis-à-vis de l'orangé, est acide vis-à-vis de la phtaléine. Ici, on ne peut avoir affaire qu'au second mélange, de phosphates monosodique et disodique.

A 10 centimètres cubes de la solution, on ajoute une goutte d'orangé, puis de l'acide sulfurique N/10 jusqu'à avoir le virage du jaune au rose (soit x centimètres cubes). On a alors transformé PO^4Na^2H en PO^4NaH^2, et x représente la quantité de soude corres-

---

(1) Il faut se rappeler que $PO^4H^3 = 98$, $PO^4NaH^2 = 120$, $PO^4Na^2H = 142$ et $PO^4Na^3 = 164$.

pondant au phosphate disodique présent, qui est donné en grammes par litre, par :

$$x \times 0{,}0142 \times 100.$$

Maintenant, à 10 centimètres cubes de liqueur primitive, on ajoute une goutte de phtaléine, puis de la soude N/10 jusqu'à virage au rose (soit y centimètres cubes). Il est facile de voir que l'on a transformé PO^4NaH^2 en PO^4Na^2H, autrement dit y mesure le phosphate monosodique présent, que l'on obtient, en grammes par litre, par la formule :

$$y \times 0{,}012 \times 100.$$

71. — 3° Le liquide est alcalin vis-à-vis des deux indicateurs. On peut avoir affaire au phosphate trisodique seul, à son mélange avec le phosphate bisodique, ou à un mélange de phosphate trisodique avec un excès de soude.

On ajoute alors à 10 centimètres cubes de solution une goutte de phtaléine, puis de l'acide sulfurique N/10 jusqu'à virage du rose à l'incolore (soit x centimètres cubes la quantité versée). On a alors transformé le phosphate trisodique PO^4Na^3 en phosphate disodique PO^4Na^2H.

D'autre part, si à 10 centimètres cubes de liquide on ajoute une goutte d'orangé, puis de l'acide sulfurique N/10 jusqu'à virage du jaune au rose, on transforme le tout en phosphate monosodique PO^4NaH^2 (soit y centimètres cubes la quantité versée). Si $y = 2x$, c'est qu'il s'agit de phosphate trisodique seul, car il

faut deux fois plus d'acide pour le transformer en PO^4NaH^2 qu'en PO^4Na^2H.

Mais, si $y > 2x$, on a le mélange $PO^4Na^2H + PO^4Na^3$. Dans ce cas, x représente l'acide nécessaire pour transformer PO^4Na^3 en PO^4Na^2H, c'est-à-dire que x mesure le phosphate trisodique ; celui-ci est donc donné, en grammes par litre, par la formule :

$$x \times 0{,}0164 \times 100.$$

Comme $2x$ représente l'acide nécessaire pour amener ce même phosphate trisodique à l'état de phosphate monosodique, la différence $y - 2x$ est la quantité d'acide correspondant au phosphate bisodique; ce dernier est donné, en grammes par litre, par :

$$(y - 2x) \times 0{,}0142 \times 100.$$

Il est évident que si l'alcalinité de ce dernier mélange vis-à-vis de la phtaléine disparaissait par addition d'une seule goutte d'acide, on aurait affaire à du phosphate bisodique seul, qui serait dès lors titré facilement en présence d'orangé [1].

Dosage de l'acide phosphorique

72. — *Dosage volumétrique par l'urane.* Il repose sur la précipitation de l'acide phosphorique à l'état de phos-

---

[1] Lorsqu'il s'agit d'un mélange de phosphate trisodique avec un excès de soude, on a $y < 2x$. Dans ce cas la différence $y - x$ correspond au phosphate trisodique.

phate d'urane insoluble dans l'acide acétique. La fin de la précipitation est obtenue lorsqu'une goutte de liquide donne avec le ferrocyanure de potassium une coloration rouge brun de ferrocyanure uranique, indiquant la présence d'un excès d'urane. Comme le procédé à la touche est laborieux, on peut aussi opérer en présence de teinture de cochenille, qui vire du jaune rougeâtre au vert en présence d'un excès d'urane.

Le visage de la cochenille est difficile à saisir lorsqu'on opère dans des liquides complexes, comme l'urine. Aussi est-il avantageux de combiner les deux méthodes : on emploie la cochenille pour déterminer le moment où l'opération est près de sa fin, et on termine alors exactement à l'aide du ferrocyanure.

73. — A 20 centimètres cubes d'urine on ajoute 1 centimètre cube de teinture de cochenille, puis on neutralise. Si l'urine est trop acide, on verse goutte à goutte de l'ammoniaque diluée jusqu'à virage au rouge violacé ; si elle est alcaline, on ajoute de l'acide nitrique étendu jusqu'à virage au jaune rougeâtre. On verse maintenant 2 centimètres cubes de solution d'acétate de sodium à 10 $^0/_0$, puis 3 gouttes d'acide acétique cristallisable, on porte à l'ébullition et on fait couler dans le liquide bouillant la solution de nitrate d'urane (contenant par litre 40 grammes de nitrate d'urane et 10 grammes d'acétate de sodium) jusqu'à virage au vert bien net. On fait tomber une gouttelette de liquide sur un grain de ferrocyanure de potassium, qui devient rose ou brun, lorsque la précipitation est terminée [1].

---

[1] La coloration se produit plus ou moins vite, suivant la

S'il n'y a pas de coloration, on ajoute encore 2 gouttes de solution d'urane, et ainsi de suite jusqu'à réaction positive au ferrocyanure.

La solution d'urane est titrée en opérant de la même manière avec 20 centimètres cubes d'une solution de phosphate acide d'ammonium $PO^4H^2NH^4$ à $3^{gr},24$ par litre. Chaque centimètre cube de celle-ci renferme $0^{gr},002$ d'anhydride phosphorique P^2O^5.

Le rapport du nombre de centimètres cubes de solution d'urane employé pour précipiter l'urine au nombre de centimètres cubes employé avec la liqueur titrée de phosphate, multiplié par 2, donne la richesse de l'urine en P^2O^5 par litre.

74. — *Dosage par pesée.* Il est basé sur la précipitation de l'acide phosphorique à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien; celui-ci est transformé par calcination en pyrophosphate de magnésium que l'on pèse.

Le cas le plus complexe est celui où l'acide phosphorique combiné se trouve non seulement en présence des métaux alcalins, mais encore de Ca, de Mg, de Fe, comme dans les cendres d'origine animale ou végétale, l'urine, etc. On devra empêcher la précipitation de ces derniers métaux sous l'action de l'ammoniaque en opérant en présence du citrate d'ammonium.

75. — Soit à, doser par exemple, l'acide phosphorique

---

grosseur des grains que l'on emploie. Aussi est-il préférable d'opérer toujours avec des grains de même grosseur, d'environ 1 millimètre cube.

dans l'urine. A 50 centimètres cubes du liquide, on ajoute 1 gramme d'acide citrique dissous dans quelques centimètres cubes d'eau, puis 10 centimètres cubes de solution de chlorure d'ammonium à 10 $^0/_0$, 3 à 4 centimètres cubes de solution de chlorure de magnésium à 10 $^0/_0$ et enfin, goutte à goutte, de l'ammoniaque, en agitant, jusqu'à ce que l'on perçoive nettement l'odeur ammoniacale. Le précipité ne tarde pas à se former ; quand il ne paraît plus augmenter, on ajoute un volume d'ammoniaque égal au tiers du volume total, on mélange, on couvre le verre, et on abandonne au repos pendant vingt-quatre heures [1].

On décante sur un filtre à analyse et on lave avec de l'eau contenant 1/5 d'ammoniaque, tant que le liquide filtré, acidulé par l'acide nitrique, précipite par addition de nitrate d'argent. A la fin, pour entraîner tout le précipité sur le filtre, on emploie l'eau ammoniacale par petites quantités (quelques centimètres cubes à la fois), et on se sert, pour détacher les cristaux qui adhèrent aux parois du verre, d'un agitateur dont l'extrémité est garnie d'un petit morceau de tube de caoutchouc (de 1 à 2 centimètres de longueur). On fait sécher le filtre et son contenu à l'étuve à 100°, on détache *autant que possible*, avec un pinceau, le précipité du filtre, on incinère ce dernier dans un creuset de porcelaine, et, après refroidissement, le précipité est ajouté dans le creuset. On chauffe de nouveau et on porte lentement au rouge pour transformer le phos-

---

[1] Un repos de deux heures suffit lorsque la précipitation commence aussitôt ; dans ces conditions, la sursaturation du phosphate ammoniaco-magnésien n'est pas à craindre.

phate ammoniaco-magnésien PO^4MgNH^4 en pyrophosphate magnésien $P^2O^7Mg^2$, en s'arrêtant quand le précipité est devenu blanc ou tout au moins grisâtre [1].

Le phosphate contient un peu de magnésie, provenant de la calcination de l'urate ammoniaco-magnésien qui se précipite en même temps que le phosphate. Pour un dosage approché, on peut peser sans tenir compte de cette cause d'erreur. Si on veut l'éliminer, il faut redissoudre le résidu de la calcination dans 3 à 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendu de son volume d'eau, et maintenir au bain-marie pendant une heure, afin de transformer le pyrophosphate en orthophosphate. On étend d'un peu d'eau, on filtre pour enlever le charbon (s'il y a lieu), on ajoute un grain d'acide citrique, on précipite par un léger excès d'ammoniaque, puis on ajoute 1/3 de volume d'ammoniaque. Après repos, le précipité, recueilli sur un filtre, est traité comme ci-dessus ; enfin, le pyrophosphate de magnésium est pesé après refroidissement. Le poids p obtenu, multiplié par $0,6396 \times 20$, donne la quantité d'anhydride P^2O^5 par litre d'urine.

---

[1] Si le précipité reste coloré en noir, on le mouille, après refroidissement, avec une goutte d'acide nitrique, on évapore doucement et on porte au rouge. Le résidu est alors tout à fait blanc.

CHAPITRE III

GLUCOSES ET SUCRES HYDROLYSABLES

Matières sucrées et saccharigènes

76. — La composition centésimale de ces substances répond le plus généralement à la formule $C^n(H^2O)^m$, dans laquelle n et m sont variables ; elles sont souvent désignées, à cause de cette composition, sous le nom assez impropre d'hydrates de carbone ou de substances hydrocarbonées.

Elles comprennent :

1° Les glucoses, matières sucrées réductrices, de formule générale $C^nH^{2n}O^n$, dans laquelle n varie de 3 à 6 ;

2° Leurs produits de condensation ou saccharides, auxquels il faut ajouter quelques dérivés naturels, soit de substitution comme les méthylglucoses $C^nH^{n-1}O^nCH^3$, soit d'hydrogénation comme les mannites $C^nH^{2n+2}O^n$.

Les saccharides peuvent être formés par la condensation de 2, 3, 4, ..., n molécules d'un même glucose ou de glucoses différents, avec élimination de 1, 2, 3, ..., $n - 1$ molécules d'eau ; on leur donne, d'après cette constitution, le nom de disaccharides, trisaccha-

rides,... et, d'une manière générale, de polysaccharides.

Les polysaccharides les moins élevés sont très solubles dans l'eau, cristallisables et de saveur douce ; suivant le mode de liaison des molécules qui les forment, ils conservent ou non une fonction réductrice à l'état libre. En raison de ces propriétés, on leur donne le nom de sucres hydrolysables, réducteurs ou non réducteurs.

Les polysaccharides élevés sont, en général, peu solubles ou insolubles dans l'eau froide, difficilement cristallisables ou même amorphes. On peut les diviser, suivant leur fonction biologique, en polysaccharides complexes de réserve et en polysaccharides complexes de soutien.

Aux substances énumérées ci-dessus, qui appartiennent toutes à la série grasse, se rattache le groupe des inosites ou sucres de la série cyclique.

Quant aux glucosides, ils peuvent être considérés comme des saccharides hétérogènes dans lesquels une molécule d'un glucose ou d'un sucre hydrolysable réducteur est soudée à une molécule de constitution chimique tout à fait différente, par exemple à un phénol ou à un alcool aromatique.

Réactions des sucres réducteurs
Action caramélisante des alcalis

77. — Quand on fait bouillir une solution de glucose ou d'un autre sucre réducteur avec une solution de potasse ou de soude, ou avec de la chaux, le liquide se colore en jaune plus ou moins foncé par suite de la production de caramel,

Cette réaction se produit encore, quoique avec moins d'intensité, si l'on emploie des sels à réaction alcaline (carbonate de sodium, de potassium, etc.).

Propriétés réductrices
Préparation du réactif cupropotassique

78. — Quand on verse de la potasse dans du sulfate de cuivre, il se fait un précipité bleu d'hydrate cuivrique insoluble dans un excès de potasse ; il se dissout au contraire si le mélange renferme en outre certains composés organiques, glycérine, mannite, glucose, tartrates, etc., qui contiennent plusieurs fonctions alcooliques. Cette observation sert de base à la préparation du réactif cupropotassique proposé d'abord par Barreswill, mais le plus souvent désigné sous le nom de liqueur de Fehling.

On obtient un bon réactif en suivant les indications données par Pasteur. On prépare les deux solutions suivantes :

Sulfate de cuivre pur.....	40 grammes
Eau.....	300 centimètres cubes

et :

Soude en plaques[1].....	130 grammes
Tartrate neutre de potassium...	160 —
Eau.....	700 centimètres cubes

---

[1] On peut remplacer la soude en plaques par 330 centimètres cubes de lessive à 36° B ; on ajoute alors 350 centimètres cubes d'eau seulement.

On verse la solution cuivrique dans la liqueur alcaline, en agitant, on porte à l'ébullition que l'on maintient pendant un quart d'heure, puis on laisse reposer. On décante avec soin pour ne pas entraîner le dépôt formé, et on complète à 1 litre avec de l'eau distillée.

Ce liquide est conservé à l'abri de la lumière ; il s'altère avec le temps. Mis à bouillir dans un tube à essai après avoir été dilué de 2 à 3 volumes d'eau, il doit rester parfaitement limpide. Lorsqu'il est trop vieux, il donne naissance à un précipité d'oxydule et, dans ce cas, doit être rejeté.

79. — *Emploi du réactif.* Si on place dans un tube à essai quelques centimètres cubes de ce réactif, que l'on porte à l'ébullition et que l'on verse goutte à goutte une solution de sucre réducteur (glucose, par exemple), on voit se former un précipité rouge d'oxyde cuivreux en même temps que la liqueur se décolore plus ou moins. La formation d'oxyde cuivreux est due à la réduction de l'hydrate cuivrique, dont une partie de l'oxygène est utilisée pour l'oxydation du sucre :

$$2Cu\,(OH)^2 = Cu^2O + O + 2H^2O.$$

Lorsque le sucre est en excès, non seulement tout le cuivre est précipité, mais on observe une coloration jaune due à l'action caramélisante de l'alcali contenu dans le réactif.

Lorsqu'il y a peu de sucre et en présence de certaines substances organiques, l'oxydule de cuivre, au lieu d'être dense et d'un beau rouge vif, est d'abord orangé,

jaune ou même verdâtre et ne se dépose que difficilement. Ce cas se présente assez souvent lorsqu'on recherche le sucre dans l'urine.

80. — *Autres réactions réductrices.* L'action réductrice des sucres à fonction aldéhydique ou cétonique peut encore se manifester, en milieu alcalin, vis-à-vis d'autres métaux (mercure, bismuth, argent) ou de certaines matières organiques (acide picrique). On peut s'en assurer de la manière suivante :

Deux à trois centimètres cubes de solution étendue de glucose, versés dans un tube à essai, sont additionnés d'une pastille de potasse et d'une pincée de chlorure mercurique. Par chauffage, le précipité blanc jaunâtre passe au gris, puis au noir.

81. — En remplaçant dans l'essai précédent le chlorure mercurique par le nitrate basique de bismuth, on a un précipité blanc qui devient noir par ébullition. Cet essai est très sensible.

82. — Dans un tube à essai bien nettoyé par ébullition avec un peu d'acide nitrique et de bioxyde de plomb, et soigneusement lavé, on place 5 centimètres cubes d'une solution étendue de nitrate d'argent (à 1 ou 2 $^0/_0$, par exemple), et on verse goutte à goutte de l'ammoniaque étendue jusqu'à ce que le précipité d'oxyde d'argent soit redissous. On ajoute alors 2 à 3 centimètres cubes d'une solution étendue de glucose, on agite et on chauffe très légèrement. On voit se déposer sur le tube un enduit brillant d'argent métallique (miroir).

83. — Les sucres réduisent aussi des substances organiques telles que l'acide picrique. Si à 4 ou 5 centimètres cubes de solution d'acide picrique on ajoute un léger excès de soude, une goutte de solution de glucose, et qu'on porte à l'ébullition, on a une coloration rouge sang due à l'acide picramique qui se produit, d'après l'équation :

$$C^6H^2.OH\ (NO^2)^3 + H^2O = C^6H^2.OH\ (NH^2)\ (NO^2)^2 + O^3.$$

Réactions colorées furfuriques

84. — Quand on chauffe un sucre réducteur avec un acide de concentration convenable, il se produit un composé furfurique ; ce dernier peut être condensé avec un phénol, et il se forme une combinaison dont la couleur dépend de la nature du sucre et de celle du phénol utilisé. Si l'on prend de l'orcine, en présence d'acide chlorhydrique concentré, la coloration est violet bleu avec les pentoses, rouge orangé avec les méthylpentoses et les hexoses. (G. Bertrand). Avec la phloroglucine et l'acide chlorhydrique concentré, la coloration est rouge dans tous les cas.

85. — On opère de la manière suivante :

Dans un tube à essai, on verse 2 à 3 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur et concentré, on ajoute quelques milligrammes d'orcine et autant de sucre à examiner, puis on chauffe doucement ; la coloration caractéristique apparaît en quelques instants, souvent précédée d'une légère teinte jaune. En continuant

à chauffer, la quantité du produit coloré augmente et celui-ci finit par précipiter. Il faut chauffer *très doucement* (40-50°) pour éviter l'apparition trop rapide du précipité, la réaction étant particulièrement nette dans le première phase de l'opération, lorsque la matière colorante est encore dissoute. D'ailleurs, si l'on chauffe trop fort, on peut détruire le sucre en produisant des matières ulmiques de couleur brune qui masquent la coloration.

Cette réaction a lieu à la température ordinaire, mais seulement au bout de plusieurs heures. Si l'acide chlorhydrique renferme du fer, la coloration donnée par les pentoses vire au vert.

86. — La réaction dite de Séliwanoff permet de distinguer les sucres aldéhydiques des sucres cétoniques. Elle est basée sur ce fait que ces derniers seuls donnent la réaction colorée avec de l'acide chlorhydrique *étendu de son volume d'eau*. On l'applique en général à la recherche du lévulose, et l'on prend comme phénol la résorcine; dans ce cas, on obtient une coloration rouge.

Il y a lieu de faire remarquer ici qu'en dehors des sucres réducteurs pris à l'état pur, toutes les substances qui peuvent fournir ces sucres dans les conditions de l'expérience donnent la même réaction colorée que le sucre qui en dérive. C'est ainsi que la xylane donne la coloration violet bleu des pentoses avec l'orcine chlorhydrique, que la plupart des glucosides et l'amidon donnent la coloration rouge orangé des hexoses avec le même réactif, que le saccharose et l'inuline donnent la réaction de Séliwanoff, etc.

Production et caractérisation du furfurol

87. — On obtient le furfurol par distillation du son ou de la gomme avec de l'acide chlorhydrique ou sulfurique étendu.

On opère de la manière suivante : on place dans un ballon de 250 centimètres cubes 5 grammes de gomme de cerisier (ou de gomme arabique) préalablement dissoute dans 50 centimètres cubes d'eau chaude [1], on ajoute 15 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré et une goutte d'huile (pour empêcher la formation de mousse), puis on chauffe à l'ébullition après avoir relié le col du ballon à un réfrigérant. On distille lentement, en recueillant la solution aqueuse de furfurol dans un verre à pied. On observe l'odeur du liquide et on y caractérise le furfurol par les deux réactions suivantes :

88. — *Réaction de l'orcine chlorhydrique.* Elle se fait comme dans le cas de la recherche d'un pentose, mais en remplaçant le sucre par *une seule goutte* de la liqueur furfurique (afin de ne pas diluer l'acide).

89. — *Réaction de l'acétate d'aniline.* Quelques centimètres cubes de solution furfurique, additionnés de quelques gouttes d'acide acétique et d'une goutte d'aniline, se colorent en rouge vif. On peut aussi mouiller

---

(1) On peut, au lieu de gomme, employer un mélange de 10 grammes de son avec 50 centimètres cubes d'eau.

avec le liquide qui distille une bande de papier à filtrer préalablement imbibée d'acétate d'aniline et séchée.

Action de la phénylhydrazine sur les sucres

90. — *Formation de la mannose-hydrazone.* La mannose donne avec la phénylhydrazine, à froid, une combinaison peu soluble, caractéristique, qui sert à le reconnaître et à le séparer.

Cette combinaison se fait molécule à molécule avec élimination d'eau :

$$CH^2OH\text{-}(CHOH)^4\text{-}CHO + NH^2\text{-}NH.C^6H^5 = CH^2OH\text{-}(CHOH)^4\text{-}CH{=}N\text{-}NH.C^6H^5 + H^2O.$$

La réaction s'applique au cas d'un sucre aldéhydique, et elle devient :

$$CH^2OH\text{-}(CHOH)^3\text{-}CO\text{-}CH^2OH + NH^2\text{-}NH.C^6H^5 = CH^2OH\text{-}(CHOH)^3\text{-}\underset{\underset{N\text{-}NH.C^6H^5}{\|}}{C}\text{-}CH^2OH + H^2O.$$

dans le cas d'un sucre cétonique.

Il en résulte que 180 grammes de mannose exigent 108 grammes de phénylhydrazine ; pour préparer la combinaison, on titre approximativement la solution de mannose et on en déduit la quantité de base à ajouter, que l'on dissout dans l'acide acétique étendu.

91. — Par exemple, on place dans un verre à pied 50 centimètres cubes d'une solution de mannose à

2 % environ ; on y ajoute 6 à 7 centimètres cubes d'une solution d'acétate de phénylhydrazine [1] et on agite : le liquide se trouble, puis il se dépose de la mannose-hydrazone qui apparaît au microscope sous forme de sphéro-cristaux (*fig.* 4). Elle est fusible vers 198-199° au bloc Maquenne.

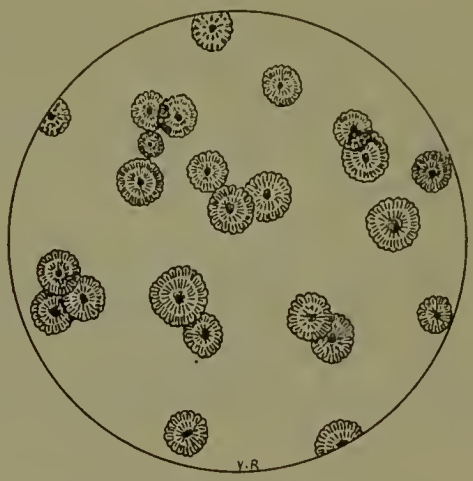


Fig. 4. — Mannose-hydrazone.

92. — *Formation des osazones des sucres.* Tous les sucres réducteurs donnent avec la phénylhydrazine, *à chaud* et en présence d'*un excès* d'acétate de phénylhydrazine, des combinaisons cristallisées peu solubles, jaunes, auxquelles on donne le nom d'osazones. Deux

---

[1] Pour préparer cette solution, on mélange :

Phénylhydrazine.....		10 grammes
Acide acétique cristallisable..		10 centimètres cubes
Eau.....	Q. S. pour	100 —

molécules de base entrent en réaction avec une molécule de sucre ; il y a en même temps mise en liberté d'hydrogène qui ne se dégage pas, mais réagit sur la base en excès pour donner de l'aniline.

Ainsi avec le glucose, on a la réaction :

$$CH^2OH\text{-}(CH.OH)^3\text{-}CHOH\text{-}CHO + 3NH^2\text{-}NH.C^6H^5 =$$
$$CH^2OH\text{-}(CHOH)^3\text{-}CH\text{-}CH{=}N\text{-}NH\text{-}C^6H^5 + 2H^2O + C^6H^5.NH^2 + NH^3.$$
$$\overset{\|}{N}\text{-}NH.C^6H^5$$

93. — Pour préparer la glucosazone, on chauffe au

Fig. 5. — Glucosazone.

bain-marie, dans un matras, pendant une heure, un mélange de 50 centimètres cubes de solution de glucose à 1 % avec 10 centimètres cubes de la solution acétique de phénylhydrazine indiquée ci-dessus. On laisse refroidir, puis on jette sur un filtre la bouillie cristalline, et on lave à fond à l'eau, puis à l'alcool mé-

thylique [1], à plusieurs reprises, en employant en tout 20 centimètres cubes de ce dissolvant. On sèche alors les cristaux jaune clair en les exprimant entre des doubles de papier à filtrer. Ils sont assez purs pour que l'on puisse prendre le point de fusion.

Ce procédé ne s'applique qu'aux osazones très peu

Fig. 6. — Galactosazone.

solubles dans l'alcool méthylique comme la glucosazone et la galactosazone. Pour celles qui sont assez solubles dans l'eau et les solvants organiques, comme la maltosazone et la lactosazone, on les purifie en les faisant dissoudre dans l'eau bouillante et les recristallisant plusieurs fois.

Les osazones ont des points de fusion très différents (voir page 456) ; elles ont aussi des formes cristallines

---

[1] La très faible solubilité dans l'alcool méthylique est caractéristique de la glucosazone et de la galactosazone (G. Bertrand).

assez variables. Pour les examiner au microscope, on pose sur une lame porte-objet une goutte du liquide dans lequel se sont produits les cristaux, on recouvre d'une lamelle et on examine. Avec un grossissement de 500 diamètres, la glucosazone apparaît en cristaux jaunes groupés en pinceaux ou en éventails d'aiguilles

Fig. 7. — Arabinosazone.

très déliées (*fig.* 5). La galactosazone est visible au même grossissement en lamelles libres ou groupées de diverses manières (*fig.* 6) ; l'arabinosazone est en longs filaments très fins, recourbés et enchevêtrés (*fig.* 7); la xylosazone, en longues et belles aiguilles (*fig.* 8) ; la maltosazone donne des lamelles le plus souvent groupées en rosaces, etc.

94. — *Recherche d'un sucre réducteur en présence de saccharose.* Pour rechercher un sucre réducteur en présence de saccharose, on ne peut chauffer avec le

réactif indiqué plus haut (§ **91**), qui contient un excès d'acide acétique, lequel intervertirait la saccharose.

Dans ce cas, on prépare le mélange suivant :

Chlorhydrate de phénylhydrazine.		3 grammes
Acétate de sodium.....		4gr,5
Eau.....	Q. S. pour	30 centimètres cubes

Fig. 8. — Xylosazone.

3 centimètres cubes de ce mélange suffisent pour 0gr,10 de sucre réducteur. On peut chauffer au bain-marie pendant une heure.

Action isomérisante des alcalis sur les sucres réducteurs

95. — Si on laisse en contact pendant quelque temps temps une solution d'un sucre réducteur avec un peu de

potasse ou de soude, le sucre se transforme partiellement en isomères.

Le glucose, par exemple, donne un mélange de lévulose et de mannose; l'isomérisation n'est pas totale, une partie du glucose restant inaltérée (Lobry de Bruyn et van Ekenstein).

Il est facile de montrer l'isomérisation du glucose. Pour cela, on place dans un tube à essai 10 centimètres cubes de solution de glucose à 5 $^0/_0$, et on ajoute 1 centimètre cube de solution de potasse à 10 $^0/_0$. On bouche et on abandonne à l'étuve à 35° pendant 24 heures. On fait refroidir, on ajoute 2 à 3 gouttes d'acide acétique pour neutraliser, puis 1 centimètre cube de la solution d'acétate de phénylhydrazine (§ **91**) et on agite. Après quelques instants, le liquide se trouble et laisse déposer de la mannose-hydrazone insoluble.

On peut déceler la présence du lévulose en prélevant une ou deux gouttes de liquide, avant l'addition de la phénylhydrazine, et en essayant la réaction de Séliwanoff (§ **86**). On obtient une coloration rouge intense.

Détermination du point de fusion

96. — Un grand nombre de corps éprouvent un commencement de décomposition lorsqu'on les chauffe au voisinage de leur point de fusion pendant un certain temps; il en résulte que celui-ci est abaissé par les produits de décomposition, d'autant plus que ces derniers sont plus abondants, c'est-à-dire d'autant plus que la chauffe est longue. On n'obtient donc des résultats constants que si on opère à la température minime

pour laquelle la fusion est instantanée ; on y arrive en projetant sur une masse métallique de température connue des fragments très petits de substance, qui peuvent ainsi se mettre instantanément en équilibre de température avec le métal (bloc Maquenne).

Pour prendre le point de fusion d'une substance, une osazone, par exemple, préparée à l'état pur, on en sèche une petite quantité que l'on pulvérise ensuite finement. On chauffe le bloc Maquenne au moyen de la rampe à gaz, de manière à avoir une montée rapide de la température (3 à 5° par minute environ). Tous les 5° on projette une parcelle de substance à la surface du bloc, et on note la température pour laquelle la fusion est instantanée.

On laisse alors refroidir le bloc de quelques degrés au-dessous de ce point, et on le réchauffe très lentement, de manière à avoir une ascension du thermomètre de 1° par trois à quatre minutes environ ; on projette, de degré en degré, une parcelle de substance, et on peut noter la température de fusion instantanée très exactement.

Ainsi la glucosazone fond vers 230-232°, lorsqu'elle est bien pure ; la présence de très petites quantités d'impuretés abaisse notablement ce point de fusion, ce qui est d'ailleurs un fait général.

La méthode ne convient pas pour les substances dont le point de fusion est inférieur à 100-120° et en particulier pour les corps gras. On utilise alors le procédé du tube capillaire (voir § **205**).

Acides dérivés des sucres

97. — *Acides monobasiques obtenus par oxydation au brome.* Les sucres qui doivent leur fonction réductrice à la présence d'un groupement aldéhydique sont facilement oxydés par le brome en présence de l'eau ; ils donnent un acide monobasique par transformation du groupement terminal -CHO en carboxyle :

$$R\text{-}CHO + H^2O + Br^2 = R\text{-}COOH + 2HBr.$$

Ceux, au contraire, qui doivent leur pouvoir réducteur à la présence d'un groupement cétonique ne sont pas oxydés dans ces conditions. On peut se baser sur cette propriété pour séparer, par exemple, le glucose et le lévulose.

On peut choisir comme exemple de transformation d'un sucre aldéhydique en acide monobasique l'oxydation du xylose. L'acide xylonique formé donne un dérivé très peu soluble qui permet de caractériser de petites quantités de sucre de bois.

98. — *Préparation du xylonobromure de cadmium.* Placer dans un tube à essai assez large 10 centimètres cubes d'une solution de xylose suffisamment concentrée (10 %) ; ajouter un demi-centimètre cube de brome, boucher et agiter de temps à autre jusqu'à dissolution complète du brome. Il se fait de l'acide xylonique et de l'acide bromhydrique. Après quarante-huit heures l'oxydation est terminée ; on chasse l'excès de brome en faisant bouillir sous une hotte le contenu du tube

(placer à côté un verre à pied pour pouvoir y poser le tube en cas de suffocation). On sature le liquide, versé dans une petite capsule de porcelaine, au moyen de carbonate de cadmium ajouté par petites portions, en chauffant ; on met un petit excès de carbonate, et on fait bouillir ensuite pendant au moins cinq minutes, à

Fig. 9. — Xylonobromure de cadmium.

cause de la présence de la lactone xylonique. On filtre bouillant : par refroidissement, on obtient souvent un précipité cristallin de xylonobromure de cadmium.

On favorise sa formation soit en amorçant, soit en additionnant le liquide de la moitié de son volume d'alcool.

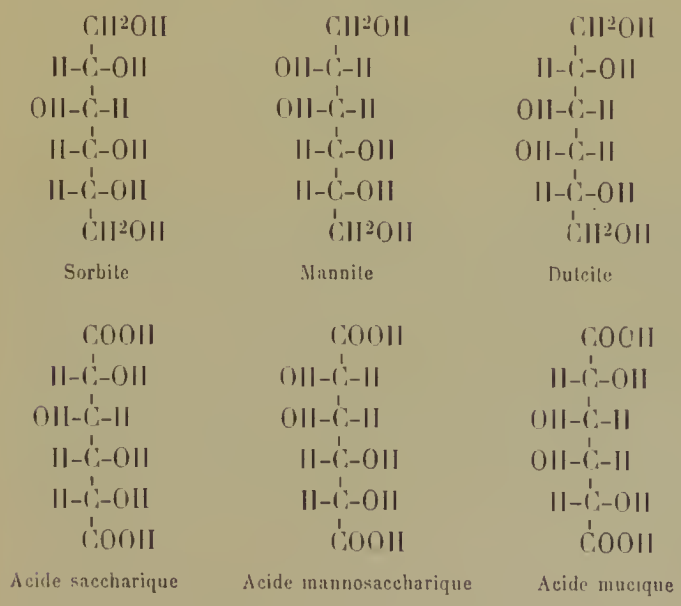
Au microscope, il se présente en aiguilles prismatiques diversement groupées, souvent en sphéro-cristaux (*fig.* 9), répondant à la formule $C^5H^9O^6CdBr+H^2O$.

Ce sel ne présente pas un point de fusion net. On eut le recueillir sur un filtre, le laver avec un peu

d'alcool étendu de son volume d'eau, et sécher ensuite. Si on l'introduit dans un tube à essai et si on chauffe, on obtient une décomposition avec un boursouflement analogue à celui du sulfocyanate de mercure (G. Bertrand).

99. — *Acides bibasiques obtenus par oxydation nitrique des sucres.* Lorsqu'on chauffe les sucres aldéhydiques avec de l'acide nitrique dilué, ils s'oxydent à chaque extrémité de la chaîne en donnant un acide bibasique de formule générale $COOH\text{-}(CHOH)_n\text{-}COOH$.

En particulier, le glucose fournit l'acide saccharique de formule correspondant à celle de la sorbite, le mannose donne l'acide mannosaccharique correspondant à la mannite, et le galactose se change en acide mucique correspondant à la dulcite.



100. — *Recherche du glucose par la formation de l'acide saccharique.* On chauffe au bain-marie, dans une capsule de 125 centimètres cubes de capacité, 2 grammes de glucose et 10 centimètres cubes d'acide nitrique de densité 1,2 (obtenu en mélangeant 2 parties d'acide à 36° B. et 1 partie d'eau, *en poids*), jusqu'à ce qu'il s'établisse une vive réaction avec dégagement

Fig. 10. — Saccharate acide de potassium.

de vapeurs rutilantes (opérer sous la hotte). On éloigne le feu un moment, et, lorsque la réaction est calmée, on évapore à sirop très clair pour chasser l'excès d'acide. On reprend alors par 5 à 6 centimètres cubes d'eau, on sature par du carbonate de potassium sec et pulvérisé, à chaud, puis on verse dans un verre à pied, et on ajoute 3 à 4 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable. Par agitation et refroidissement, on voit se former un dépôt cristallin blanc de saccharate acide de potassium peu soluble, qui caractérise l'acide saccharique.

Au microscope (*fig.* 10), ce sel se présente en aiguilles

transparentes groupées en rosaces et très acérées (objectif 5 ou 8, ocul. 2).

101. — *Recherche du galactose par formation d'acide mucique.* Tous les corps susceptibles de fournir du galactose par hydrolyse donnent lieu, par oxydation, à la production d'acide mucique.

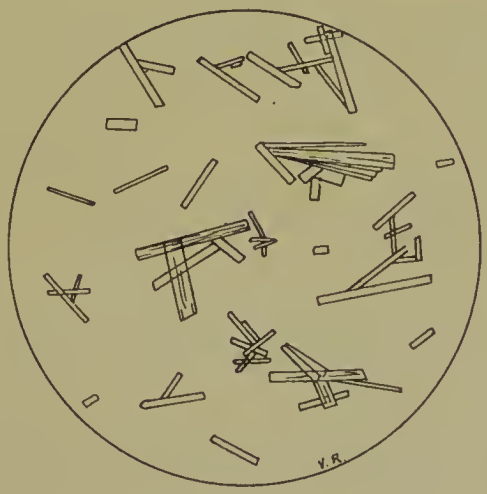


Fig. 11. — Acide mucique.

Ainsi, le lactose, traité par l'acide nitrique, fournit un mélange d'acide saccharique (glucose) et mucique (galactose). La présence de ce dernier est facile à constater, par suite de sa presque insolubilité dans l'eau.

On opère exactement, comme pour le glucose, sur 2 grammes de sucre ; mais, lorsque l'oxydation est terminée, que la majeure partie de l'acide nitrique a été chassée par évaporation [1], on reprend par 3 à 4 centi-

[1] On évapore jusqu'à ce que le poids du résidu soit le double de celui du lactose, soit 4 grammes.

mètres cubes d'eau, on verse dans un verre et on lave la capsule avec un peu d'eau de manière à avoir en tout 10 centimètres cubes. Il se produit assez rapidement un précipité blanc d'acide mucique, qui, au microscope (*fig.* 11), apparaît sous forme de petits prismes courts (obj. 8, oc. 2).

Le poids de cet acide, recueilli sur un filtre après vingt-quatre heures, fournit un moyen de doser approximativement le galactose dans un mélange ; c'est ainsi que 1 gramme de sucre de lait fournit dans ces conditions environ $0^{gr},33$ d'acide mucique séché à 110°.

On vérifie qu'il s'agit bien d'acide mucique en essayant la solubilité dans l'ammoniaque : le précipité doit s'y dissoudre intégralement. Dans le cas où on opérerait sur un mélange renfermant un sel de calcium, comme l'oxydation donne toujours de l'acide oxalique, il se formerait de l'oxalate calcique, peu soluble dans les acides dilués, que l'on pourrait prendre au premier abord pour de l'acide mucique. Cet oxalate est, comme on sait, insoluble dans l'ammoniaque.

Principaux sucres hydrolysables et glucoses qui en dérivent

	Disaccharides en $C^{12}H^{22}O^{11}$:	Produits d'hydrolyse			
		Glucose	Galactose	Lévulose	Rhamnose
		—	—	—	—
Non réducteurs..	Saccharose..	1 mol.	»	1 mol.	»
	Tréhalose...	2 mol.	»	»	»
Réducteurs . . .	Maltose.....	2 mol.	»	»	»
	Lactose.....	1 mol.	1 mol.	»	»

	Produits d'hydrolyse			
	Glucose	Galactose	Lévulose	Rhamnose
TRISACCHARIDES en $C^{18}H^{32}O^{14}$:	—	—	—	—
Rhamninose.....	1 mol.	»	»	2 mol.
TRISACCHARIDES en $C^{18}H^{32}O^{16}$:				
Raffinose.....	1 mol.	1 mol.	1 mol.	»
Mélézitose.....	2 mol.	»	1 mol.	»
Gentianose.....	2 mol.	»	1 mol.	»
Manninotriose.....	1 mol.	2 mol.	»	»
TÉTRASACCHARIDES en $C^{24}H^{42}O^{21}$:				
Stachyose.....	1 mol.	2 mol.	1 mol.	»

Interversion du saccharose

102. — Si on chauffe dans un tube à essai, à l'ébullition, quelques centimètres cubes d'une solution étendue de saccharose (à 1 ou 2 %) avec un égale volume de liqueur de Fehling, on n'observe aucune réduction.

Si on chauffe au préalable 5 centimètres cubes du liquide sucré à l'ébullition, pendant une ou deux minutes, avec une goutte d'acide chlorhydrique, que l'on sature ensuite avec quelques gouttes de soude à 1 %, on peut voir que le liquide réduit abondamment le réactif cupro-potassique : c'est que le saccharose a été dédoublé par l'ébullition avec les acides en un mélange équimoléculaire de glucose et de lévulose, tous deux réducteurs.

Recherche des princi

Corps très solubles dans l'eau froide, non précipitables par
tion réductrice et susceptible de produire une osazone.

Chauffée avec l'orcine chlorhydrique, la substance donne une coloration	bleu ou bleu violet	l'osazone est assez soluble dans l'eau bouillante ; elle cristallise en :	lamelles solu longs fila froid avec la longues ai cadmium...
	rouge ou rouge orangé	l'osazone est presque insoluble dans l'eau bouillante et l'alcool méthylique. Elle cristallise en :	aiguilles fondant à 230-232° (glucosazone)
			lames fondant à 214°
		l'osazone est notablement soluble dans l'eau bouillante et l'alcool méthylique	le pouvoir augmente l'hydro

paux sucres réducteurs

l'acétate de plomb (neutre ou basique), et donnant une solu-

bles dans le benzène. Le sucre réduit à froid.....			*dioxycétone.*
ments flexibles et enchevêtrés. Le sucre précipite à *p*-bromophénylhydrazine.....			*arabinose.*
guilles rigides. Le sucre donne du xylonobromure de			*xylose.*
avec la résorcine et l'acide chlorhydrique à 50 %, le sucre donne :	pas de coloration	il précipite à froid avec la phénylhydrazine..	*mannose.*
		pas de précipité à froid ; par oxydation nitrique, acide saccharique	*glucose.*
	coloration rouge	sucre à fort pouvoir rotatoire lévogyre...	*lévulose.*
avec la résorcine et l'acide chlorhydrique à 50 %	pas de coloration ; par oxydation nitrique, acide mucique.....		*galactose.*
réducteur après lyse.	par oxydation nitrique, donne de l'acide saccharique.....		*maltose.*
	par oxydation nitrique, acide mucique ; réaction de Rubner positive		*lactose.*

Réaction colorée du lactose

103. — Lorsqu'on chauffe à l'ébullition, pendant quelques minutes, la solution d'un sucre réducteur additionnée d'acétate de plomb et d'ammoniaque, il se produit une coloration variant du jaune au rouge cuivré. En se plaçant dans des conditions déterminées, le lactose donne une coloration rouge, tandis que la plupart des autres sucres, le glucose en particulier, donnent une teinte jaune (Rubner). Cette réaction peut être utilisée pour distinguer les deux sucres précités, même dans des solutions assez étendues pour que les autres méthodes ne puissent donner de résultat (à la dilution de $0^{gr},5$ à 1 gramme par litre).

104. — A 10 centimètres cubes d'une solution de lactose à 0,1 $^0/_0$, on ajoute environ 1 gramme d'acétate de plomb cristallisé, on chauffe légèrement pour dissoudre, puis on ajoute de l'ammoniaque goutte à goutte, en agitant ; le précipité se redissout d'abord, puis finit par persister suffisamment pour que le liquide soit fortement troublé (il faut de 1 à 2 centimètres cubes d'ammoniaque). On cesse alors d'ajouter l'ammoniaque, dont un excès nuirait à la réaction. Le mélange, porté à l'ébullition pendant deux ou trois minutes, se colore en rose ou en orangé et, après quelques instants de repos, on a un précipité rose vif surmonté d'un liquide orangé ou rose.

En opérant exactement de même avec une solution de glucose *de même concentration*, on a par le repos un

précipité blanc ou jaunâtre, surmonté d'un liquide jaune clair.

Avec des solutions plus concentrées de sucre, il est nécessaire d'augmenter la proportion d'acétate de plomb et par conséquent celle de l'ammoniaque.

Dosage volumétrique des sucres réducteurs

105. — *Méthode exacte.* Elle consiste dans l'emploi d'une solution alcaline d'oxyde de cuivre dont on fait bouillir un excès avec un volume connu de la solution du sucre à doser. L'oxyde cuivreux précipité est ensuite dosé volumétriquement à l'aide d'une méthode dont le principe a été indiqué autrefois par Mohr. Cette méthode consiste à traiter l'oxydule de cuivre par une solution acide de sulfate ferrique. L'oxydule se dissout à l'état de sulfate de cuivre ordinaire, tandis qu'une proportion correspondante de sel ferrique passe à l'état de sel ferreux :

$$Cu^2O + (SO^4)^3 Fe^2 + SO^4H^2 = 2SO^4Cu + H^2O + 2SO^4Fe.$$

On dose ce dernier au permanganate de potassium, et l'on peut ainsi, en s'appuyant sur l'équation ci-dessus, calculer la quantité de cuivre qui a été précipitée par le sucre.

On commence par préparer les liqueurs suivantes :

A. — *Liqueur cuivrique*

Sulfate de cuivre pur.....	40 grammes
Eau distillée.....	Q. S. pour 1 litre

B. — *Liqueur sodique*

Sel de Seignette	200 grammes
Soude caustique en plaques[1]	150 —
Eau distillée	Q. S. pour 1 litre

C. — *Liqueur ferrique*

Sulfate ferrique	50 grammes
Acide sulfurique	200 —
Eau distillée	Q. S. pour 1 litre

D. — *Liqueur permanganique*

Permanganate de potassium	5 grammes
Eau distillée	Q. S. pour 1 litre

La liqueur ferrique ne doit pas réduire le permanganate de potassium. On s'en assure en y ajoutant, avec précaution, de la liqueur oxydante; un faible changement de coloration doit apparaître déjà après quelques gouttes. Sinon on verserait du permanganate jusqu'à ce que ce résultat soit atteint; la liqueur ferrique serait alors prête pour l'usage.

106. — Quand on veut doser la quantité de sucre contenue dans une solution, on prend une fiole conique de 125 à 150 centimètres cubes de capacité, et l'on y verse 20 centimètres cubes de la solution sucrée. Ces 20 centimètres cubes peuvent contenir jusqu'à 100 milligrammes de sucre réducteur, mais il est préférable qu'ils en renferment un peu moins: c'est entre 10 et 90 milligrammes que les résultats sont les plus précis[2].

---

(1) On peut remplacer la soude en plaques par 375 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B.

(2) Si la quantité convenable du sucre est contenue dans un volume moindre de solution, on doit compléter les 20 centimètres

On ajoute à la solution sucrée 20 centimètres cubes de liqueur cuivrique, 20 centimètres cubes de liqueur sodique, et l'on chauffe jusqu'à l'ébullition, qu'on maintient exactement trois minutes. On évite une ébullition vive qui concentrerait trop le liquide. Après les trois minutes d'ébullition, on retire la fiole du feu, on laisse déposer un instant l'oxydule de cuivre et on passe le liquide surnageant à travers un filtre d'amiante. La couleur de ce liquide doit indiquer nettement la présence d'un excès de cuivre ; s'il en était autrement, c'est que la quantité de sucre employée aurait été trop grande, et il faudrait recommencer le dosage.

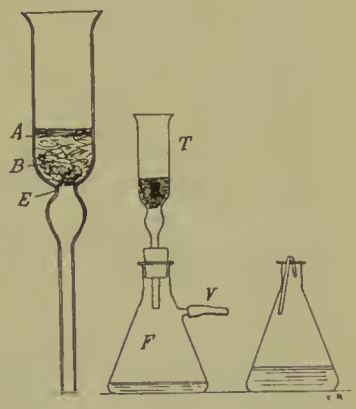


Fig. 12. — Filtre à amiante.

Pour la filtration, on se sert d'un tube à amiante T [1] genre Soxhlet, monté à l'aide d'un bouchon de caoutchouc sur une fiole conique F, pas trop épaisse, de

---

cubes avec de l'eau versée directement dans la fiole conique ; il est nécessaire que le volume final soit constant.

[1] Le tube à amiante a 14 centimètres de longueur totale. La partie supérieure, de 6 centimètres de longueur et de 17 millimètres environ de diamètre, est cylindrique. Ce tube est assez fortement étranglé pour retenir l'amiante et se prolonge au-dessous de l'étranglement E par une partie tirée en cône, qui rentre dans le bouchon de caoutchouc. On obtient un bon filtre en opérant comme il suit : on choisit de l'amiante en grosses fibres un peu dures et l'on en fait une pelote sphérique, du diamètre du tube, que l'on pousse jusqu'à l'étranglement, en la pressant un peu. Au-dessus, on place une petite couche d'amiante beaucoup plus fine, obtenue en broyant de l'amiante ordinaire, à fibres douces, avec de l'eau ; on décante

150 centimètres cubes de capacité (*fig.* 12). On fait le vide dans la fiole par l'intermédiaire d'une tubulure latérale V [1].

Il est recommandable d'entraîner le moins possible l'oxydule de cuivre sur le filtre; il y formerait un dépôt compact qui ne se dissoudrait plus avec toute la rapidité désirable dans la liqueur ferrique. Lorsque le liquide surnageant le précipité d'oxydule de cuivre a été séparé, on délaie le précipité dans un peu d'eau ; on laisse déposer encore une fois et on décante le liquide de lavage sur le filtre. La fiole à filtration est alors vidée et rincée ; elle est prête à servir à la seconde partie de l'opération, c'est-à-dire au dosage du cuivre réduit.

Ce dosage s'effectue d'une manière très simple et très rapide : on dissout l'oxydule de cuivre dans la liqueur ferrique ajoutée peu à peu, en remuant, en

---

les parties les plus fines qu'on met à part; on jette la bouillie restante sur le tampon et on essore.

Enfin, on termine la préparation du filtre en y faisant passer les portions les plus fines de l'amiante qu'on a séparées par broyage et décantation. La dernière couche A ainsi obtenue, celle qui agit vraiment comme filtre, doit avoir au moins 2 à 3 millimètres d'épaisseur; les deux premières lui servent simplement de support: elles ont ensemble à peu près 1 centimètre. On doit veiller à ce que chaque couche ait une épaisseur régulière et une surface horizontale. Quand on a un peu d'habitude, il suffit de quelques instants pour préparer un très bon filtre d'amiante pouvant servir à un très grand nombre de dosages (quelquefois plusieurs centaines).

[1] Chaque fois que l'on fait le vide dans un appareil au moyen de la trompe, il est nécessaire de se rappeler que toute diminution brusque de pression de l'eau qui traverse la trompe peut amener une rentrée d'eau dans les appareils. On se prémunira contre cet accident en intercalant entre la trompe et l'appareil dans lequel on fait le vide un flacon d'un demi-litre environ qui retient l'eau entrée fortuitement.

quantités suffisantes, 5, 10, 20 centimètres cubes. Le précipité passe instantanément du rouge vif au bleu noir, puis donne une solution limpide, d'un beau vert d'eau. On verse cette solution sur le filtre pour dissoudre au passage la petite quantité d'oxydule qui y est retenue. Si celle-ci tarde trop à disparaître, on délaie un peu, avec un agitateur, la couche superficielle du filtre, pour augmenter les points de contact avec la liqueur ferrique, et on modère la vitesse de la filtration en cessant de faire le vide. S'il est nécessaire, on ajoute encore quelques centimètres cubes de liqueur ferrique [1]. Enfin, quand tout l'oxydule est dissous, on lave la fiole d'Erlenmeyer et le filtre avec de l'eau distillée, puis on titre le liquide rassemblé dans la fiole à filtration avec le permanganate. Le virage est extrêmement net et se distingue aussi bien à la lumière artificielle qu'en plein jour : la couleur passe du vert au rose avec une seule goutte de permanganate en excès; souvent une partie notable de la dernière goutte de liqueur oxydante est utilisée pour terminer la transformation du sel ferreux en sel ferrique, et il ne reste plus que juste assez de permanganate pour compenser la teinte verte du liquide; celui-ci semble alors se décolorer brusquement ; si on ajoute une goutte de plus, on obtient une coloration rose intense.

La durée des opérations est de quinze à vingt minutes.

---

[1] Il peut arriver, après un assez grand nombre d'opérations, que des poussières accumulées noircissent la partie supérieure du filtre d'amiante. On enlève alors avec précaution la couche filtrante, on la sèche, on la calcine, puis on la remet en place.

Pour le calcul, on voit, d'après l'équation :

$$(1) \quad Cu^2O + (SO^4)^3Fe^2 + SO^4H^2 = 2SO^4Cu + H^2O + 2SO^4Fe$$

déjà donnée, que 2 atomes de cuivre précipités par le sucre réducteur correspondent à 2 molécules de sulfate ferreux, c'est-à-dire à 2 atomes de fer à oxyder par le permanganate. Il n'y a donc qu'à déterminer préalablement le titre en cuivre de la solution de permanganate. On trouve ensuite, dans l'un des tableaux ci-joints (p. 92-97), la correspondance entre les poids de cuivre et ceux des principaux sucres réducteurs (G. Bertrand).

107. — Au lieu de sel ferreux, il est préférable d'employer l'oxalate d'ammonium pour le titrage du permanganate. C'est un sel qui n'est ni efflorescent, ni hygroscopique, et qu'il est très facile de se procurer à l'état pur. On en pèse 250 milligrammes (ou une quantité voisine) qu'on met dans une capsule de porcelaine avec 50 à 100 centimètres cubes d'eau et 1 ou 2 centimètres cubes d'acide sulfurique pur; on chauffe vers 60-80° et l'on verse la solution de permanganate jusqu'à coloration rose (environ 22 centimètres cubes). L'ammoniaque du sel n'intervient pas, mais seulement l'acide oxalique[1].

Or, d'après les réactions ci-dessous :

$$(2) \quad 10SO^4Fe + 2MnO^4K + 8SO^4H^2 = 5\,(SO^4)^3\,Fe^2 + 2SO^4Mn + SO^4K^2 + 8H^2O,$$

$$(3) \quad 5C^2H^2O^4 + 2MnO^4K + 3SO^4H^2 = 10CO^2 + 2SO^4Mn + SO^4K^2 + 8H^2O,$$

---

[1] On pourrait également se servir d'acide oxalique, mais ce corps, cristallisé avec 2 molécules d'eau, est efflorescent et ne présente pas, en conséquence, les garanties de son sel ammoniacal.

1 molécule d'acide oxalique ou, ce qui revient au même, 1 molécule d'oxalate d'ammonium cristallisé : $C^2H^2O^4, 2NH^3 + H^2O$ (poids moléculaire 142,1) équivaut à 2Fe, soit, d'après l'équation (1), à 2Cu.

En multipliant le poids d'oxalate par $\frac{63,6 \times 2}{142,1}$ ou 0,895, on a la quantité de cuivre qui correspond au volume de solution de permanganate employé pour amener la coloration rose. Si on divise cette quantité par le nombre de centimètres cubes de permanganate, on obtient le titre de ce dernier, c'est-à-dire le nombre de milligrammes de cuivre correspondant à chaque centimètre cube de permanganate.

En chiffres ronds, 1 litre de solution de permanganate équivaut à 10 grammes de cuivre. En effet on voit que 10Fe (ou 10Cu) correspondent à $2MnO^4K$, ou, en prenant les poids moléculaires, que 1 gramme de permanganate correspond à $2^{gr},010$ de cuivre.

Les tableaux de correspondance ci-joints sont rapportés à des sucres anhydres.

Pour quelques sucres, dont le dosage est peu fréquent, on n'a pas cru nécessaire d'établir les tableaux de milligramme en milligramme. En cas de besoin, il suffira d'interpoler.

Enfin, en raison de l'extrême ressemblance des tableaux relatifs au glucose et au sucre interverti, on s'est dispensé d'établir un tableau spécial pour le lévulose. Il est d'ailleurs très rare qu'on ait à doser une solution de ce sucre pur ; si un tel cas se présentait, on pourrait se contenter des chiffres donnés pour le sucre interverti.

Glucose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
—	—	—	—	—	—
10	20,4	41	79,3	71	131,4
11	22,4	42	81,1	72	133,1
12	24,3	43	82,9	73	134,7
13	26,3	44	84,7	74	136,3
14	28,3	45	86,4	75	137,9
15	30,2	46	88,2	76	139,6
16	32,2	47	90,0	77	141,2
17	34,2	48	91,8	78	142,8
18	36,2	49	93,6	79	144,5
19	38,1	50	95,4	80	146,1
20	40,1	51	97,1	81	147,7
21	42,0	52	98,9	82	149,3
22	43,9	53	100,6	83	150,9
23	45,8	54	102,3	84	152,5
24	47,7	55	104,1	85	154,0
25	49,6	56	105,8	86	155,6
26	51,5	57	107,6	87	157,2
27	53,4	58	109,3	88	158,8
28	55,3	59	111,1	89	160,4
29	57,2	60	112,8	90	162,0
30	59,1	61	114,5	91	163,6
31	60,9	62	116,2	92	165,2
32	62,8	63	117,9	93	166,7
33	64,6	64	119,6	94	168,3
34	66,5	65	121,3	95	169,9
35	68,3	66	123,0	96	171,5
36	70,1	67	124,7	97	173,1
37	72,0	68	126,4	98	174,6
38	73,8	69	128,1	99	176,2
39	75,7	70	129,8	100	177,8
40	77,5				

Sucre interverti

Solution à 0,5 % obtenue en hydrolysant 4gr,750 de saccharose dissous dans 50 centimètres cubes d'HCl à 2 %, par chauffage à 100° pendant dix à quinze minutes, puis laissant refroidir, neutralisant et diluant à 1 litre.

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	20,6	41	79,5	71	130,8
11	22,6	42	81,2	72	132,4
12	24,6	43	83,0	73	134,0
13	26,5	44	84,8	74	135,6
14	28,5	45	86,5	75	137,2
15	30,5	46	88,3	76	138,9
16	32,5	47	90,1	77	140,5
17	34,5	48	91,9	78	142,1
18	36,4	49	93,6	79	143,7
19	38,4	50	95,4	80	145,3
20	40,4	51	97,1	81	146,9
21	42,3	52	98,8	82	148,5
22	44,2	53	100,6	83	150,0
23	46,1	54	102,3	84	151,6
24	48,0	55	104,0	85	153,2
25	49,8	56	105,7	86	154,8
26	51,7	57	107,4	87	156,4
27	53,6	58	109,2	88	157,9
28	55,5	59	110,9	89	159,5
29	57,4	60	112,6	90	161,1
30	59,3	61	114,3	91	162,6
31	61,1	62	115,9	92	164,2
32	63,0	63	117,6	93	165,7
33	64,8	64	119,2	94	167,3
34	66,7	65	120,9	95	168,8
35	68,5	66	122,6	96	170,3
36	70,3	67	124,2	97	171,9
37	72,2	68	125,9	98	173,4
38	74,0	69	127,5	99	175,0
39	75,9	70	129,2	100	176,5
40	77,7				

Mannose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	20,7	60	113,3
20	40,5	70	130,2
30	59,5	80	146,9
40	78,0	90	163,3
50	95,9	100	179,4

Galactose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	19,3	41	75,6	71	126,6
11	21,2	42	77,4	72	128,3
12	23,0	43	79,1	73	130,0
13	24,9	44	80,8	74	131,5
14	26,7	45	82,5	75	133,1
15	28,6	46	84,3	76	134,8
16	30,5	47	86,0	77	136,4
17	32,3	48	87,7	78	138,0
18	34,2	49	89,5	79	139,7
19	36,0	50	91,2	80	141,3
20	37,9	51	92,9	81	142,7
21	39,7	52	94,6	82	144,6
22	41,6	53	96,3	83	146,2
23	43,4	54	98,0	84	147,8
24	45,2	55	99,7	85	149,4
25	47,0	56	101,5	86	151,1
26	48,9	57	103,2	87	152,7
27	50,7	58	104,9	88	154,3
28	52,5	59	106,6	89	156,0
29	54,4	60	108,3	90	157,6
30	56,2	61	110,0	91	159,2
31	58,0	62	111,6	92	160,8
32	59,7	63	113,3	93	162,4
33	61,5	64	115,0	94	164,0
34	63,3	65	116,6	95	165,6
35	65,0	66	118,3	96	167,2
36	66,8	67	120,0	97	168,8
37	68,6	68	121,7	98	170,4
38	70,4	69	123,3	99	172,0
39	72,1	70	125,0	100	173,6
40	73,9				

Sorbose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	15,4	60	88,4
20	30,5	70	102,3
30	45,3	80	115,9
40	59,9	90	129,4
50	74,2	100	142,8

Rhamnose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr	CUIVRE en milligr.
10	19,3	60	111,0
20	38,2	70	128,2
30	56,8	80	145,4
40	75,2	90	162,2
50	93,2	100	178,6

Arabinose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	21,2	60	119,3
20	41,9	70	137,5
30	62,0	80	155,3
40	81,5	90	172,7
50	100,6	100	189,8

Xylose

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	20,1	60	113,2
20	39,6	70	130,6
30	58,7	80	147,6
40	77,3	90	164,2
	95,4	100	180,5

Maltose

Le tableau ci-dessous se rapporte au sucre anhydre.

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
—	—	—	—	—	—
10	11,2	41	45,2	71	77,6
11	12,3	42	46,3	72	78,6
12	13,4	43	47,4	73	79,7
13	14,5	44	48,5	74	80,8
14	15,6	45	49,5	75	81,8
15	16,7	46	50,6	76	82,9
16	17,8	47	51,7	77	84,0
17	18,9	48	52,8	78	85,1
18	20,0	49	53,9	79	86,1
19	21,1	50	55,0	80	87,2
20	22,2	51	56,1	81	88,3
21	23,3	52	57,1	82	89,4
22	24,4	53	58,2	83	90,4
23	25,5	54	59,3	84	91,5
24	26,6	55	60,3	85	92,6
25	27,7	56	61,4	86	93,7
26	28,9	57	62,5	87	94,8
27	30,0	58	63,5	88	95,8
28	31,1	59	64,6	89	96,9
29	32,2	60	65,7	90	98,0
30	33,3	61	66,8	91	99,0
31	34,4	62	67,9	92	100,1
32	35,5	63	68,9	93	101,1
33	36,5	64	70,0	94	102,2
34	37,6	65	71,1	95	103,2
35	38,7	66	72,2	96	104,2
36	39,8	67	73,3	97	105,3
37	40,9	68	74,3	98	106,3
38	41,9	69	75,4	99	107,4
39	43,0	70	76,5	100	108,4
40	44,1				

Lactose

Le tableau ci-dessous se rapporte au sucre anhydre.

SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.	SUCRE en milligr.	CUIVRE en milligr.
10	14,4	41	56,7	71	95,4
11	15,8	42	58,0	72	96,6
12	17,2	43	59,3	73	97,9
13	18,6	44	60,6	74	99,1
14	20,0	45	61,9	75	100,4
15	21,4	46	63,3	76	101,7
16	22,8	47	64,6	77	102,9
17	24,2	48	65,9	78	104,2
18	25,6	49	67,2	79	105,4
19	27,9	50	68,5	80	106,7
20	28,4	51	69,8	81	107,9
21	29,8	52	71,1	82	109,2
22	31,1	53	72,4	83	110,4
23	32,5	54	73,7	84	111,7
24	33,9	55	74,9	85	112,9
25	35,2	56	76,2	86	114,1
26	36,6	57	77,5	87	115,4
27	38,0	58	78,8	88	116,6
28	39,4	59	80,1	89	117,9
29	40,7	60	81,4	90	119,1
30	42,1	61	82,7	91	120,3
31	43,4	62	83,9	92	121,6
32	44,8	63	85,2	93	122,8
33	46,1	64	86,5	94	124,0
34	47,4	65	87,7	95	125,2
35	48,7	66	89,0	96	126,5
36	50,1	67	90,3	97	127,7
37	51,4	68	91,6	98	128,9
38	52,7	69	92,8	99	130,2
39	54,1	70	94,1	100	131,4
40	55,4				

108. — *Méthode par décoloration.* Cette méthode, très fréquemment employée, est plus simple et en apparence plus rapide que la précédente. En raison des circonstances multiples qui peuvent influer sur la décoloration (durée de l'opération, réoxydation partielle du précipité, etc.), elle fournit des résultats moins certains; on peut augmenter la précision en recommençant le dosage, mais il faut alors plus de temps que par la méthode indiquée ci-dessus.

Le dosage est basé sur l'emploi d'une liqueur de Fehling titrée dont on décolore exactement un volume connu à l'aide de la solution sucrée, contenue dans une burette graduée. Cette solution doit être à environ 0,5 $^0/_0$ de sucre réducteur [1].

109. — On verse 10 centimètres cubes de liqueur de Fehling, mesurés exactement à l'aide d'une pipette, dans un petit ballon ou dans une fiole conique d'environ 125 centimètres cubes, on ajoute 20 centimètres cubes d'eau et on porte à l'ébullition. On laisse tomber dans le liquide bouillant, d'abord par petites portions d'un demi-centimètre cube, puis goutte à goutte, la solution à titrer, en maintenant l'ébullition et en agitant constamment. L'opération est terminée dès que le liquide est tout à fait incolore. Il faut une certaine habitude pour déterminer exactement ce point. Pour y arriver, il est nécessaire, vers la fin de l'opération, d'enlever de temps en temps le liquide du feu et de

---

[1] Il est nécessaire d'amener par dilution la solution à titrer à une concentration en sucre voisine de 0,5 $^0/_0$, en se guidant sur le résultat d'un premier essai.

le laisser reposer pendant un moment. On examine la couleur du liquide qui surnage le précipité ; lorsque ce liquide n'est plus que très légèrement coloré en bleu, il faut faire attention de ne plus ajouter la solution sucrée que par dixièmes de centimètre cube ou même par gouttes, en maintenant chaque fois l'ébullition pendant une minute. Si le liquide surnageant, au lieu d'être bleu ou incolore, devient jaune clair, c'est l'indice que l'on a mis un excès de sucre.

110. — Pour titrer la liqueur de Fehling, on opère de la même manière, en se servant d'une solution renfermant exactement $0^{gr},500$ de glucose pur dans 100 centimètres cubes. Comme il est difficile de trouver du glucose tout à fait pur et que le sucre interverti possède le même pouvoir réducteur que le glucose, on peut prendre du saccharose que l'on intervertit. On pèse exactement $0^{gr},475$ de ce sucre, on les met dans une fiole jaugée de 100 centimètres cubes avec 50 centimètres cubes d'eau et 1 centimètre cube d'acide chlorhydrique pur, et on place sur le bain-marie bouillant où on maintient pendant dix à quinze minutes. On refroidit, on sature l'acide avec un peu de lessive alcaline ou de carbonate de sodium, et on complète le volume à 100 centimètres cubes. La solution renferme exactement 500 milligrammes de sucre interverti (342 grammes de saccharose correspondant à 360 grammes de sucre interverti).

On appelle titre de la liqueur de Fehling le nombre de milligrammes de glucose (ou de sucre interverti) nécessaire pour décolorer exactement 10 centimètres cubes du réactif. Ce titre ne diminue que lentement

quand on conserve la solution à l'obscurité. Le réactif préparé suivant la formule de Pasteur a un titre voisin de 55.

Quand on procède à un dosage, le calcul se fait à l'aide de la formule suivante :

$$C = \frac{T}{10v},$$

dans laquelle C est la concentration, c'est-à-dire la quantité de sucre contenue dans 100 centimètres cubes du liquide ; T est le titre du réactif cupro-potassique, et v le volume de solution sucrée employé à la décoloration de 10 centimètres cubes de celui-ci.

Dans le cas où l'on aurait à doser un autre sucre réducteur que le glucose ou le sucre interverti, par exemple du maltose ou du lactose, le réactif devrait être titré avec le sucre correspondant.

111. — Lorsqu'on veut seulement faire des comparaisons, déterminer un pouvoir réducteur maximum, etc., sans chercher autre chose qu'une indication approximative, on peut employer une série de tubes à essais dans chacun desquels on verse 1 ou 2 centimètres cubes de Fehling et un volume égal d'eau. On fait bouillir et on verse dans chaque tube, goutte à goutte, les différents liquides à comparer, en comptant le nombre de gouttes nécessaires pour amener la décoloration. Il faut naturellement d'autant moins de gouttes que la solution est plus riche en sucre.

Polarimétrie

112. — *Vérification de l'appareil.* Avant de se servir d'un polarimètre, il faut en vérifier le réglage et, s'il est nécessaire, le mettre au zéro. Nous décrirons le réglage du polarimètre Laurent.

On dispose devant l'appareil une flamme monochromatique jaune (obtenue simplement en posant un fragment fondu d'un mélange équimoléculaire de chlorure de sodium et de phosphate bisodique sur la cloison en nickel d'un bec Méker), puis on déplace le zéro de quelques degrés vers la droite ou vers la gauche, de manière à obtenir un disque divisé verticalement en deux moitiés d'inégale intensité lumineuse. On met l'oculaire au point afin que la ligne verticale de séparation soit aussi nette que possible. Lorsque ce résultat est obtenu, on fait tourner le bouton moleté jusqu'au moment où les deux demi-disques ont rigoureusement le même aspect. Le champ de l'appareil se présente comme un disque de coloration jaune uniforme, divisé en deux parties égales par une ligne verticale très fine. Si l'appareil est bien réglé, on doit, en observant le cadran divisé, obtenir une coïncidence exacte entre le zéro du vernier et celui de la graduation. En pratique, il peut y avoir, suivant la plus ou moins grande habitude de l'observateur, une légère différence soit à droite, soit à gauche; celle-ci ne doit pas dépasser deux minutes. Il est bon, en faisant mouvoir la molette, de recommencer deux à trois fois cette dernière partie de l'opération, de manière à déterminer la limite d'approximation à laquelle on arrive dans la coïncidence des zéros.

Si l'appareil est insuffisamment réglé, c'est-à-dire si l'écart est supérieur à deux minutes à droite ou à gauche, on place les zéros en coïncidence exacte, et on déplace l'analyseur à l'aide de la petite vis placée au-dessus de l'oculaire jusqu'à ce que les deux demi-disques aient la même intensité d'éclairage. Le réglage est alors obtenu.

113. — *Mesure de la rotation fournie par une solution donnée.* On verse doucement la solution à examiner (au moyen d'une pipette, par exemple) dans un des tubes du polarimètre, maintenu légèrement incliné pour éviter d'emprisonner des bulles d'air, jusqu'à ce qu'il se forme un ménisque convexe au-dessus de l'orifice, le tube étant alors placé verticalement. On fait glisser la rondelle de verre sur l'extrémité du tube, de manière à chasser l'excès de liquide, sans qu'il s'introduise d'air dans l'intérieur; on essuie le liquide qui s'est écoulé et on fixe la rondelle de verre au moyen de la fermeture à baïonnette.

On couche le tube dans la gouttière du polarimètre, on rabat le couvercle et on examine l'aspect du champ éclairé. Si les deux demi-disques paraissent également éclairés, le liquide est dépourvu d'activité optique; si l'un est plus éclairé que l'autre, le liquide est doué du pouvoir rotatoire. Les appareils sont construits de telle sorte que, si le pouvoir rotatoire est droit, le demi-disque sombre est à droite; il est à gauche dans le cas contraire. Pour mesurer la valeur de ce pouvoir rotatoire, il faut ramener les deux demi-disques à la même intensité lumineuse; pour cela, en faisant tourner la molette, on entraîne le zéro de l'alidade vers la droite,

si le pouvoir rotatoire est droit (à gauche dans le cas contraire) jusqu'à ce que l'égalité d'éclairement soit produite. On lit, au moyen de la loupe, la rotation obtenue, que l'on exprime en degrés et minutes d'arc, en s'aidant du vernier. On doit toujours faire plusieurs observations, en déplaçant légèrement chaque fois l'alidade et ramenant ensuite à l'égalité; on prend la moyenne des résultats obtenus. Il est utile et parfois nécessaire, au moment de l'observation, de noter la température du liquide étudié, le pouvoir rotatoire pouvant varier notablement avec celle-ci (lévulose, sucre interverti, etc.).

114. — *Calcul du pouvoir rotatoire spécifique.* La rotation observée est nécessairement proportionnelle au pouvoir rotatoire spécifique de la substance dissoute, à la concentration de la solution et à l'épaisseur du liquide traversé par le faisceau lumineux. On rapporte habituellement le pouvoir rotatoire à une concentration supposée de 100 $^0/_0$, la déviation étant lue quand on observe la solution sous une épaisseur de 1 décimètre. On emploie fréquemment des tubes plus longs, de manière à amplifier l'importance de la déviation observée.

On a donc :

$$\alpha = \frac{[\alpha]_D \times p \times l}{100},$$

α désignant la rotation observée, $[\alpha]_D$ le pouvoir rotatoire spécifique (pour la raie D du sodium), p la richesse $^0/_0$ de la solution, et l la longueur du tube

exprimée en décimètres. De cette formule on déduit facilement :

$$[\alpha]_D = \alpha \times \frac{100}{p \times l}.$$

115. — *Dosage polarimétrique du glucose et du saccharose.* S'il s'agit d'une solution de *glucose*, on obtient sa richesse en sucre $^0/_0$ en divisant la rotation obtenue (au tube de 20 centimètres), convertie en degrés et fractions décimales de degrés, par 1,05. En effet, de la formule précédente, on déduit :

$$p = \frac{100\ \alpha}{l \times [\alpha]_D};$$

le pouvoir rotatoire spécifique étant 52°,5 pour le glucose, on obtient :

$$p = \frac{100\ \alpha}{2 \times 52{,}5} = \frac{\alpha}{1{,}05}.$$

S'il s'agit d'une solution de *saccharose*, soit pur, soit mélangé de glucose ou d'autres matières, on détermine la rotation α_1 au tube de 20 centimètres (de 22 centimètres si on a augmenté le volume de 1/10 en déféquant), et l'on a soin de noter exactement la température t. On intervertit alors en chauffant à l'ébullition 25 centimètres cubes du liquide, supposé neutre, pendant trois à quatre minutes avec $0^{cm^3},5$ d'acide chlorhydrique concentré, on refroidit, on ramène exactement au même volume de 25 centimètres cubes et on détermine la rotation α_2 en ayant soin d'opérer à la même température t que la première fois. La différence $\alpha_1 - \alpha_2$

entre les deux rotations est due uniquement à la transformation du saccharose en un mélange équimoléculaire de glucose et de lévulose. Or, la variation de rotation observée dans ces conditions avec une solution de saccharose à 1 $^0/_0$ est, à 0°, de 1°,8445 (au tube de 20 centimètres) et, à une température t°, de 1°,8445 — 0,0056t [1]. Si on divise la variation $\alpha_1 - \alpha_2$ par ce facteur, calculé pour la température observée, on a la richesse en saccharose $^0/_0$. Les substances étrangères ne gênent pas, même si elles possèdent le pouvoir rotatoire, à condition que celui-ci ne varie pas pendant l'interversion.

116. — *Dosage d'un mélange de saccharose et de sucre interverti.* C'est là un problème à deux inconnues, pour la résolution duquel deux équations sont nécessaires.

---

[1] Le saccharose se dédouble selon l'équation :

$$C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^6H^{12}O^6$$

qui montre que 1 gramme de ce sucre donne par hydrolyse 0gr,5263 de glucose et autant de lévulose. Les rotations, à 0°, sont donc, au tube de 20 centimètres, pour une solution à 1 $^0/_0$:

$$\frac{1^{gr} \times 2 \times 66,5}{100} = +1^\circ,33 \text{ avant hydrolyse.}$$

$$\left.\begin{array}{l} \dfrac{0^{gr},5263 \times 2 \times 52,5}{100} = +0^\circ,5526 \\ \dfrac{0^{gr},5263 \times 2 \times 101,38}{100} = -1^\circ,0671 \end{array}\right\} -0^\circ,5145 \text{ après hydrolyse.}$$

La différence $\alpha_1 - \alpha_2$ est donc de 1°, 8445 à 0° ; comme le pouvoir rotatoire du lévulose diminue avec la température (de 0°,56t), on a, en tenant compte de ce fait, la formule donnée plus haut

On trouve de même que, pour une solution de maltose, il convient de diviser la différence de rotation observée au tube de 20 centimètres, avant et après hydrolyse, par le coefficient 1,5048 pour avoir la richesse $^0/_0$ en maltose.

On obtiendra celles-ci soit en déterminant les pouvoirs réducteurs R_1 et R_2 avant et après hydrolyse, soit en mesurant les rotations polarimétriques également avant et après hydrolyse.

Dans le premier cas, le pouvoir réducteur R_1 correspondra à la quantité primitive de sucre interverti, R_2 à la somme de ce sucre interverti et de celui qui prend naissance par hydrolyse. La différence $R_2 - R_1$, multipliée par $\frac{342}{360} = 0,95$, permettra de calculer la proportion de saccharose.

Si on opère par la méthode optique, on calculera d'abord le saccharose d'après le changement de pouvoir rotatoire produit par l'hydrolyse, ainsi qu'il a été expliqué plus haut; cette quantité servira à calculer la déviation correspondant au saccharose, avant hydrolyse; soit α_2 cette déviation. La différence entre la rotation α_1, observée avant hydrolyse et α_2, donnera la déviation correspondant au sucre interverti.

La méthode par réduction est applicable même dans le cas où les sucres dosés sont accompagnés de substances optiquement actives, mais non réductrices; la méthode polarimétrique est applicable, au contraire,

---

Pour le lactose, le coefficient devient $0,3502 - 0,0021t$; il y a dans ce cas, augmentation de la rotation après intervention; c'est cette augmentation, observée au tube de 20 centimètres, qu'il faut diviser par le facteur indiqué.

L'hydrolyse du maltose peut être faite dans les mêmes conditions que celle du saccharose, en doublant la durée de l'ébullition; celle du lactose exige un chauffage d'une heure avec de l'acide chlorhydrique à 1 °/₀. En principe, on ne doit arrêter l'hydrolyse que lorsqu'un examen polarimétrique indique que la rotation ne varie plus.

dans le cas où les impuretés, dépourvues d'activité optique, auraient un pouvoir réducteur.

Dans beaucoup de cas, on pourra les employer simultanément (absence d'impuretés réductrices et optiquement actives); les résultats obtenus devront concorder. Ce procédé est général et applicable à d'autres mélanges sucrés.

Défécation des liquides sucrés

117. — Les liquides dans lesquels on veut doser le sucre au moyen du polarimètre doivent être peu colorés et parfaitement limpides.

On peut très souvent décolorer les solutions trop fortement teintées par agitation avec un peu de noir animal et filtration. La décoloration est plus énergique si on maintient en contact avec le noir, en chauffant au bain-marie pendant quelques instants, ou à la température ordinaire, pendant quelques heures, en agitant fréquemment.

Pour clarifier des solutions troubles, si la filtration ne suffit pas, on aura recours à l'agitation avec un peu de terre d'infusoires.

Dans beaucoup de cas, on devra avoir recours à une véritable défécation, au moyen d'un réactif approprié, sans action sur le corps dont on veut mesurer le pouvoir rotatoire.

118. — *Dosage du sucre dans l'urine.* Par exemple, pour doser le sucre dans l'urine, on défèque en ajoutant à 50 centimètres cubes d'urine 5 centimètres cubes (soit 1/10) exactement de solution d'acétate basique de

plomb [1]; on agite et on filtre. On peut alors examiner dans un tube de 11 centimètres ou de 22 centimètres (au lieu de 10 centimètres ou de 20 centimètres) de manière à ne pas avoir à faire de correction; sinon on devra ajouter au résultat obtenu 1/10 de sa valeur.

119. — *Dosage du sucre dans un sirop de fruits.* S'il s'agit d'un sirop de fruits, contenant en général un mélange de saccharose et de sucre interverti, on pèse exactement 20 grammes de sirop, que l'on verse dans une fiole jaugée de 100 centimètres cubes, et on étend avec 60 centimètres cubes d'eau. On ajoute alors goutte à goutte du sous-acétate de plomb jusqu'au maximum de précipitation (de 1 à 2 centimètres cubes) *en évitant un excès* qui redissoudrait le précipité. On amène le volume à 100 centimètres cubes avec de l'eau, on mélange bien et on filtre. On recueille exactement 50 centimètres cubes de liquide, et on y verse goutte à goutte de l'acide sulfurique pur, tant qu'il se fait un précipité. On ajoute alors une pincée de carbonate de calcium pur, afin de neutraliser exactement, on agite à plusieurs reprises, on amène le volume à 100 centimètres cubes et on filtre. On dose le sucre soit au polarimètre, soit par réduction, dans le liquide filtré, dont 10 centimètres cubes correspondent à 1 gramme de sirop.

---

[1] Pour préparer le sous-acétate de plomb, on fait dissoudre à l'ébullition 400 grammes d'acétate neutre de plomb dans 1 litre d'eau en opérant dans une grande capsule ou une bassine émaillée; on fait tomber par petites portions dans le liquide bouillant 300 grammes de litharge finement pulvérisée, en agitant continuellement. Quand la solution est à peu près totale, on laisse refroidir et on filtre.

120. — *Dosage du lactose dans le lait.* Pour doser le sucre par réduction dans un liquide riche en substances protéiques, comme le lait, on peut employer la défécation par les sels mercuriques. On ajoute à 50 centimètres cubes de lait 5 centimètres cubes exactement mesurés (soit 1/10) de solution de sulfate mercurique [1]. Après avoir agité, on verse goutte à goutte de la lessive de soude jusqu'à neutralisation, on ajoute une goutte d'acide acétique pour rendre la réaction très légèrement acide, on complète le volume à 100 centimètres cubes avec de l'eau, on mélange et on filtre à travers un filtre à plis.

Le liquide recueilli est agité avec quelques pincées de poudre de zinc, à plusieurs reprises, de manière à enlever tout le mercure en solution. Ce métal serait précipité en même temps que l'oxydule de cuivre, dans les opérations ultérieures, et gênerait le dosage. On s'assure que la précipitation du mercure est totale en déposant avec un agitateur une goutte du liquide sur une lame de cuivre rouge fraîchement décapée (avec un peu de sable et d'eau); il ne doit pas se produire de tache grise au contact de la goutte. S'il s'en produisait, même après un instant, on agiterait avec une nouvelle quantité de poudre de zinc. Finalement le liquide est filtré et utilisé pour le dosage.

Si l'on veut doser le lactose au polarimètre, on peut se contenter de coaguler les substances protéiques par

---

[1] La solution de sulfate mercurique se prépare en faisant dissoudre au bain-marie 350 grammes de ce sel dans un mélange de 120 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré et 750 centimètres cubes d'eau. On complète ensuite à 1 litre.

une solution acétique d'acide picrique (25 centimètres cubes de solution à 0,1 $^0/_0$ dans l'acide acétique à 0,25 $^0/_0$ pour 25 centimètres cubes de lait). On agite et on filtre.

CHAPITRE IV

MANNITES

Préparation de l'éther acétique de la mannite

121. — Les mannites sont des corps qui possèdent seulement des fonctions alcooliques ; à ce titre, elles présentent les réactions générales des alcools. Ainsi, elles se combinent avec les acides pour donner des éthers. La molécule fixe autant de restes d'acide qu'elle renferme d'OH alcooliques, de sorte que la mannite, par exemple, donne un éther hexacétique.

On obtiendra ce dernier en chauffant dans un tube à essai bien sec 1 gramme de mannite avec 4 à 5 grammes d'anhydride acétique et un petit fragment de chlorure de zinc fondu de la grosseur d'un grain de chènevis (2 à 3 centigrammes). Celui-ci a pour but de favoriser la réaction ; en son absence, on obtiendrait difficilement l'acétylation totale. On doit chauffer peu à peu avec précaution, en agitant ; aussitôt que la réaction commence à se déclarer, on éloigne du feu, car elle devient tout d'un coup extrêmement vive et peut se poursuivre d'elle-même par suite de la chaleur dégagée. Quand elle s'est calmée, on chauffe une seconde fois,

pour s'assurer que l'opération est terminée, on porte à l'ébullition pendant une demi-minute, puis on fait refroidir. On verse dans le tube 20 à 30 centimètres cubes d'eau et on agite fortement pour dissoudre l'excès d'anhydride acétique et le chlorure de zinc. La mannite hexacétique se précipite sous forme d'un sirop incolore qui ne tarde pas à cristalliser. On la recueille sur un filtre, on la lave à l'eau distillée, et on la fait sécher. Le rendement est théorique. On peut la purifier par une cristallisation dans l'alcool à 70° chaud ; elle fond à 119°.

Ne pas oublier que les vapeurs d'anhydride acétique sont inflammables et très irritantes.

Préparation de l'acétal de la mannite

122. — La plupart des alcools plurivalents se combinent facilement avec les aldéhydes, formique, benzoïque, etc., pour donner des acétals. Avec l'aldéhyde benzoïque et la mannite, on a :

$$\begin{array}{l} CH^2.OH \\ | \\ CH\ .OH \\ | \\ CH\ .OH \\ | \\ CH\ .OH \\ | \\ CH\ .OH \\ | \\ CH^2.OH \end{array} + C^6H^5.CHO = \begin{array}{l} CH^2.O \\ | \\ CH\ .O \\ | \\ CH\ .O \\ | \\ CH\ .O \\ | \\ CH\ .O \\ | \\ CH^2.O \end{array} \Big\rangle CH.C^6H^5 + 3H^2O.$$

Il peut se fixer autant de restes aldéhydiques qu'il y a de fois 2 OH alcooliques.

Les acétals benzoïques, en particulier, sont faciles à préparer; à peu près totalement insolubles dans l'eau,

ils servent à caractériser et à isoler un certain nombre d'alcools plurivalents.

123. — *Formation de l'acétal.* Pour préparer l'acétal benzoïque de la mannite, on dissout à chaud 5 grammes de manne, placés dans un tube à essai, avec aussi peu d'eau que possible (1 centimètre cube environ). On fait couler le sirop dans un flacon à large ouverture de 50 centimètres cubes de capacité, et on rince le tube avec 3 centimètres cubes d'acide sulfurique à 50 $^0/_0$ (en volume), que l'on fait couler dans le flacon On recommence ce lavage encore une fois avec le même volume d'acide, et on ajoute au mélange 3 centimètres cubes d'aldéhyde benzoïque, puis on bouche solidement le flacon avec un bouchon de liège et on agite vigoureusement. On obtient bientôt la prise en masse du mélange. Si la manne renferme trop d'impuretés, l'acétal tarde à se former ; il faut agiter à plusieurs reprises, souvent pendant des heures ; quelquefois même la prise en masse n'a lieu que le lendemain.

Après vingt-quatre heures, on essore à la trompe, on lave deux ou trois fois à l'eau pour enlever l'eau mère acide dans laquelle s'est formé l'acétal, puis à l'alcool à 60-70°, pour enlever l'aldéhyde benzoïque, et on fait cristalliser dans l'alcool.

Si on veut régénérer la substance sucrée de sa combinaison, on fait bouillir l'acétal avec de l'alcool renfermant 2 $^0/_0$ d'acide sulfurique jusqu'à dissolution complète ; on fait passer un courant rapide de vapeur d'eau, qui entraîne à la fois l'alcool et l'aldéhyde benzoïque régénéré. Finalement on sature l'acide sulfu-

rique par la baryte, et la mannite reste seule en dissolution.

124. — *Essorage à la trompe.* On essore à la trompe sur une rondelle de papier à filtrer maintenue

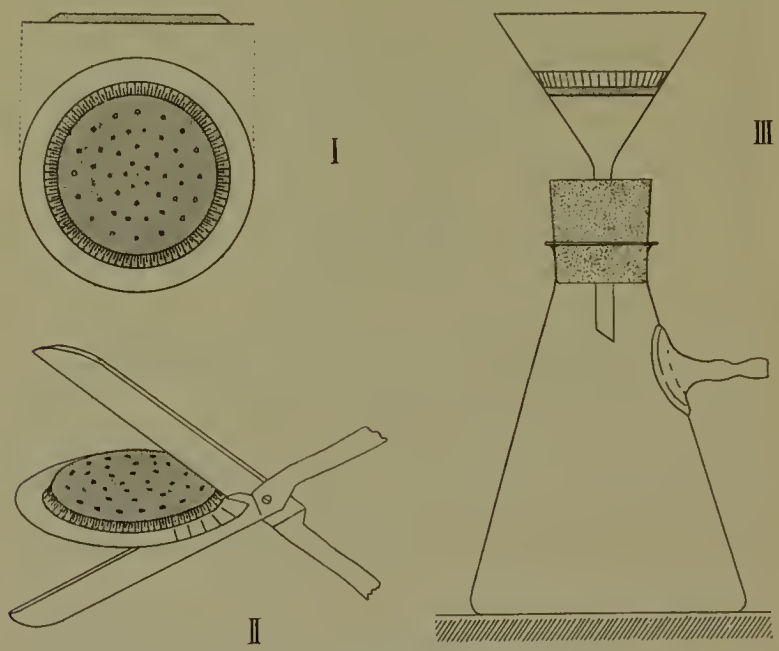


Fig. 13. — Essorage à la trompe.

dans un entonnoir à l'aide d'une plaque de porcelaine perforée. Cette plaque a la forme d'un disque, dont les bords, taillés obliquement, doivent s'appliquer contre les parois d'un entonnoir à angle de 60°. L'entonnoir est fixé au moyen d'un bouchon de caoutchouc sur une fiole conique tubulée, en verre épais, dans laquelle on peut faire le vide au moyen de la trompe à eau.

Il faut commencer par découper convenablement la rondelle de papier. Pour cela, on applique la plaque de porcelaine, par sa face la plus large, sur un carré de papier à filtrer, et on découpe avec des ciseaux un disque dont le diamètre soit supérieur d'environ un centimètre à celui de la plaque (*fig.* 13, 1er temps). On pratique ensuite avec les ciseaux, tout autour de cette rondelle, une série de coupures dirigées suivant des rayons et atteignant tout au plus le bord du disque en porcelaine (*fig.* 13, 2e temps).

Lorsque la rondelle est préparée, on la mouille avec quelques gouttes d'eau, on place le disque de porcelaine dans l'entonnoir, normalement à l'axe de celui-ci, et on applique le papier sur le disque perforé, de manière que les dentelures se relèvent et s'appliquent sur les parois de l'entonnoir, en se recouvrant par les bords.

L'appareil étant ainsi disposé, on y verse avec précaution (de manière à ne pas faire basculer la plaque filtrante) le mélange à essorer et on fait le vide en reliant la tubulure latérale à la trompe au moyen d'un caoutchouc à vide. Lorsqu'il ne coule plus de liquide, on tasse le précipité en le comprimant peu à peu, soit avec le doigt, soit avec un objet convenable (pilon, pied de verre à expériences), et on poursuit l'essorage jusqu'à ce qu'il ne passe plus de liquide.

Pour purifier complètement le résidu solide, on peut l'arroser directement sur le filtre avec de l'eau ou un liquide approprié, ou mieux l'extraire de l'entonnoir avec une spatule, en s'arrangeant pour ne pas déchirer la rondelle de papier, qui sera remise en place. La masse est introduite dans un mortier ou une capsule,

délayée dans le liquide de lavage, et versée de nouveau dans l'entonnoir. Après deux ou trois opérations semblables, la substance peut être considérée en général comme parfaitement lavée.

Caractères de l'inosite

125. — L'inosite est très répandue, soit à l'état libre, soit à l'état de combinaison phosphorique, dans le règne végétal ; on la trouve aussi, tantôt libre, tantôt combinée, dans les muscles de divers animaux.

C'est un hexaphénol qui donne facilement par oxydation un composé quinonique, l'acide rhodizonique, dont certains sels sont colorés en rouge vif ; leur formation permet de caractériser l'inosite.

Une très petite quantité d'inosite (grosse comme une tête d'épingle) étant placée dans une petite capsule de porcelaine, on la dissout dans 1 centimètre cube d'eau et on ajoute une petite goutte de réactif de Millon ; on évapore à sec au bain-marie, puis on sèche sur la flamme, vers 110-120°. L'enduit brunâtre obtenu est mouillé avec 3 à 4 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable, auquel on ajoute $0^{cm3},5$ d'eau et une goutte de solution d'acétate de strontium à 10 $^0/_0$. On évapore au bain-marie ; le liquide se colore bientôt en rouge éosine et laisse finalement sur la capsule un dépôt rouge vif.

126. — On peut aussi, pour caractériser l'inosite, mouiller un cristal de celle-ci avec une goutte de réac-

tif de Gallois [1] et évaporer à sec au bain-marie : il reste une tache rouge de rhodizonate de mercure.

---

[1] Le réactif de Gallois se prépare en dissolvant 1 gramme d'oxyde jaune de mercure dans un mélange de 1 centimètre cube d'acide nitrique et 10 centimètres cubes d'eau, puis complétant le volume à 20 centimètres cubes avec de l'eau.

CHAPITRE V

POLYSACCHARIDES ÉLEVÉS

Caractères microscopiques des amidons de diverses provenances

127. — L'amidon, substance de réserve de la plupart des végétaux, se trouve dans les cellules des plantes à l'état de grains microscopiques. Pour les examiner, on délaie dans une goutte d'eau une parcelle d'amidon, obtenue par grattage d'un tubercule de pomme de terre ou d'une graine telle que pois, haricot, maïs, etc. ; on recouvre d'une lamelle et on examine à un grossissement assez fort (obj. 8, ocul. 2). On observe que les grains sont formés de couches concentriques réunies autour d'un centre ou hile, qui est le point de départ des dépôts successifs. Le hile est généralement punctiforme, comme dans la pomme de terre ou le blé; il est allongé, linéaire dans l'amidon de haricot et des légumineuses; souvent, lorsque les grains sont desséchés, de petites fentes partent du hile. Elles atteignent rarement une grande longueur. Le hile est généralement placé au centre géométrique du grain d'amidon; il est excentrique dans la pomme de terre et l'arrow-root.

La forme générale du grain est très variable : ovoïde et plus ou moins irrégulier dans la pomme de terre et l'arrow-root, il est discoïde dans le blé et l'orge, ovale

Fig. 14. — Haricot.

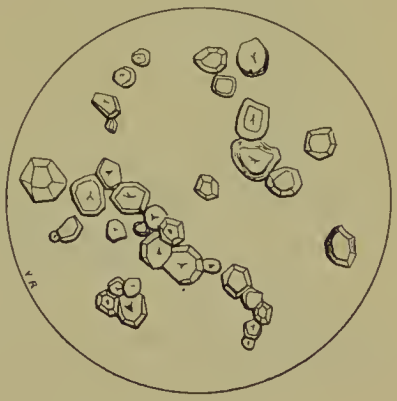


Fig. 15. — Maïs.

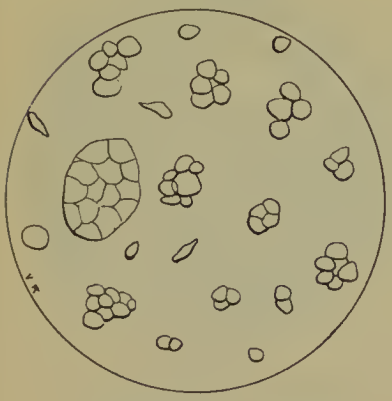


Fig. 16. — Avoine.

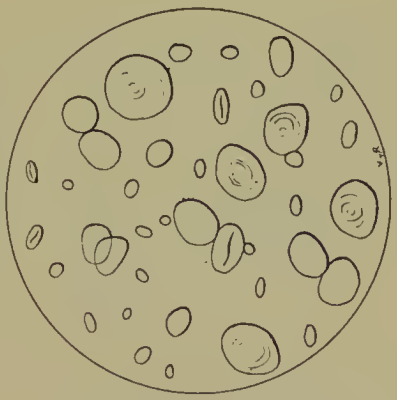


Fig. 17. — Blé.

dans le haricot, polyédrique dans le riz et le maïs (*fig.* 14 à 18).

Le plus souvent les grains sont isolés. Quelquefois cependant, comme dans l'avoine, ils sont rassemblés en amas constituant des grains composés.

La dimension des grains d'amidon est très variable, comme l'indique le tableau suivant :

Pomme de terre	140 à 185 μ
Arrow-root	150 à 160
Fève	70 à 80
Haricot	60 à 65
Pois	45 à 55
Blé	45 à 55
Maïs	25 à 35
Avoine (grains composés)	35 à 45
— (grains simples)	6 à 8
Riz (grains simples)	4 à 6

En raison de son mode d'accroissement, le grain d'amidon a une structure comparable jusqu'à un cer-

Fig. 18. — Pomme de terre (lumière naturelle).

Fig. 19. — Pomme de terre (lumière polarisée).

tain point à celle d'un sphéro-cristal, dont le hile serait le centre. Si on l'examine entre deux nicols croisés, on y aperçoit, pour cette raison, une croix noire plus ou moins régulière, suivant la forme du grain, et dont les branches partent du hile (*fig.* 19). On peut ainsi recon-

naître la place du hile dans le cas où celui-ci n'apparaît pas à l'examen microscopique en lumière ordinaire.

128. — *Action de la chaleur.* On chauffe la préparation microscopique au-dessus d'une petite flamme sans atteindre la température de l'ébullition. On remplace, s'il est nécessaire, l'eau qui s'évapore en ajoutant avec une pipette, sur le bord de la lamelle, une goutte d'eau, qui pénètre par capillarité entre la lame et la lamelle. Lorsque la température atteint 70 à 80°, selon l'espèce d'amidon, les grains se gonflent fortement et se transforment en empois. En chauffant avec précaution et en suivant l'action de la chaleur au microscope, on aperçoit souvent, au début, les couches d'accroissement d'une manière plus nette que sur le grain cru.

129. — *Action des réactifs. Potasse.* Les alcalis caustiques gonflent le grain d'amidon et le transforment en empois dès la température ordinaire. On observe très bien ce phénomène au microscope en plaçant une goutte de potasse au bord de la préparation, en contact avec la lamelle et en examinant la pénétration de l'alcali. Le phénomène de gonflement rappelle tout à fait celui qui a lieu sous l'influence de la chaleur.

130. — *Action de l'iode.* L'iode donne avec l'amidon une coloration bleue intense, assez caractéristique [1].

---

[1] Il existe à l'état dissous dans la saponaire et plusieurs autres plantes un glucoside, la saponarine, qui donne également avec l'iode une coloration bleue intense. L'amyloïde de certains tissus animaux (foie, rate, etc.) donne aussi cette coloration d'une manière plus ou moins nette.

Pour observer cette réaction, on ajoute sur le bord de la préparation une goutte de solution d'iodure de potassium iodé, ou bien on examine l'amidon dans l'eau iodée au lieu d'eau ordinaire. La coloration n'est d'un beau bleu que s'il y a très peu d'iode ; avec une plus grande quantité de réactif, les grains paraissent d'un bleu presque noir ou même bruns. En chauffant la préparation, les grains se gonflent, la coloration bleue s'éclaircit, puis disparaît. Par refroidissement, cette coloration réapparaît, mais non, bien entendu, la forme des grains d'amidon.

Saccharification de l'amidon par l'acide chlorhydrique

131. — *Préparation de l'empois d'amidon.* Peser 3 grammes de fécule de pommes de terre et les délayer dans 20-25 centimètres cubes d'eau, dans un verre à pied, en agitant bien. Chauffer à l'ébullition dans un matras 125-130 centimètres cubes d'eau et y verser, en agitant sans cesse, la suspension précédente d'amidon, de manière à avoir en tout 150 centimètres cubes.

132. — *Saccharification de l'empois.* Ajouter alors à cet empois 3 centimètres cubes exactement d'acide chlorhydrique concentré à 22° B., bien remuer et porter à l'ébullition. Prélever aussitôt 1 centimètre cube de liquide que l'on verse dans un tube à essai contenant 10 centimètres cubes d'eau ; ajouter 2 à 3 gouttes d'une solution d'iode [1] : il apparaît une belle colora-

---

[1] On prépare la solution d'iode en broyant dans un mortier

tion bleue due à la formation d'iodure d'amidon. Toutes les trois à quatre minutes, on prélève dans le ballon 1 centimètre cube de liquide que l'on traite de même par la solution d'iode. On obtient ainsi une série de teintes : bleu, violet, rouge violacé, rouge clair, acajou et marron clair. Lorsque le liquide ne se colore plus par l'iode, ce qui a lieu après vingt-cinq à trente minutes environ, on arrête l'ébullition et on vérifie que le liquide réduit fortement la liqueur de Fehling. L'amidon a été transformé par l'acide en dextrine, puis en glucose :

$$(C^6H^{10}O^5)_n + nH^2O = nC^6H^{12}O^6.$$

On voit, d'après cette équation, que 162 grammes d'amidon donnent 180 grammes de glucose, ou, ce qui revient au même, que 9 parties d'amidon donnent 10 parties de sucre réducteur. On peut se baser sur cette transformation pour doser l'amidon ; toutefois on n'obtient un résultat quantitatif que si l'on opère la saccharification à l'autoclave ou si l'on fait bouillir assez longtemps.

Extraction et caractères du glycogène

133. — *Extraction du glycogène des mollusques.* L'hépatopancréas de la moule, de l'huître, de la coque, etc., est extrêmement riche en glycogène. Pour extraire ce

---

1 gramme d'iode avec 2 grammes d'iodure de potassium et 2 à 3 centimètres cubes d'eau ; on dilue peu à peu, en agitant, et on amène le volume à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée.

dernier, on commence par broyer le corps du mollusque à l'aide d'un hache-viande ; on prend 30 grammes, par exemple, de la pulpe obtenue que l'on chauffe avec un poids égal de lessive de potasse très concentrée (faite avec 60 grammes de potasse en plaques pour 40 centimètres cubes d'eau), dans une petite capsule de porcelaine, jusqu'à dissolution totale du tissu (quarante-cinq minutes à une heure). Pendant ce chauffage, on remplace au fur et à mesure l'eau qui s'évapore. On ajoute ensuite 50 centimètres cubes d'eau et on filtre sur un tampon d'amiante, en repassant sur le filtre les premières parties. On ajoute à 50 centimètres cubes du liquide filtré 25 centimètres cubes d'alcool à 95° (soit un demi-volume). Le précipité blanc jaunâtre de glycogène se rassemble ; on décante sur un petit filtre sans plis le liquide surnageant, on lave le précipité avec 10-15 centimètres cubes d'alcool au tiers, et on le jette sur le filtre. Celui-ci est bien égoutté et essoré entre des doubles de papier à filtrer.

134. — Lorsqu'on veut simplement étudier les caractères du glycogène, on peut se contenter de redissoudre le précipité dans un peu d'eau tiède, ce qui donne une solution opalescente, que l'on neutralise par l'acide acétique. Une goutte de solution d'iode donne une coloration rouge acajou ; le liquide, additionné de 2 à 3 gouttes d'acide chlorhydrique et porté à l'ébullition pendant quelques minutes, réduit la liqueur de Fehling, par suite de la transformation du glycogène en glucose.

135. — *Centrifugation.* Comme les filtrations ci-dessus sont toujours assez difficiles, il est préférable

de centrifuger. A cet effet, on verse les liquides à éclaircir dans l'un des vases en verre du centrifugeur, on place ce vase dans son étui métallique, et on porte le tout sur le plateau d'une balance Roberval ; sur l'autre plateau, on place un second tube avec son étui métallique et on y verse de l'eau ou du liquide, de façon à obtenir exactement l'équilibre des poids. Il ne reste plus qu'à disposer la paire de tubes aux deux extrémités d'un même diamètre de la centrifugeuse et à mettre la machine en marche. La centrifugeuse doit être mise en mouvement très progressivement et maintenue en bon état de graissage. Lorsque les tubes ont tourné pendant un temps suffisant, de quelques minutes à un quart d'heure ou même davantage, suivant la nature du liquide et la vitesse de l'appareil, on arrête le moteur. Le précipité doit être nettement séparé du liquide et réuni au fond du tube en une masse assez compacte pour que la partie surnageante puisse être décantée entièrement. On peut effectuer un lavage du précipité en délayant celui-ci, dans le tube même, avec un agitateur, puis on ajoute un peu d'eau et on continue à délayer en évitant les grumeaux, enfin on dilue le tout d'un volume d'eau convenable (par exemple jusqu'à la moitié du tube) et on centrifuge à nouveau.

Quand le liquide à centrifuger est trop volumineux pour être contenu dans un seul tube ou même dans la série des tubes de la centrifugeuse, on peut, après une première centrifugation, remplacer le liquide décanté par du liquide trouble sans enlever le précipité, ce qui simplifie l'opération.

D'une manière générale, la centrifugation est toujours plus rapide que la filtration et conduit à une

séparation beaucoup plus parfaite du liquide et du précipité. En raison de ces avantages, l'emploi de la centrifugeuse tend à remplacer de plus en plus la filtration.

136. — *Recherche du glycogène dans le foie de lapin.* Un foie de lapin, extirpé aussitôt après la mort de l'animal, est divisé rapidement. On en prélève 20 grammes que l'on fait bouillir avec 20 centimètres cubes de solution concentrée de potasse, comme plus haut. La préparation est d'ailleurs continuée comme pour l'extraction du glycogène de l'hépatopancréas des mollusques.

On peut doser le glycogène, comme l'amidon, en faisant bouillir avec de l'acide chlorhydrique au 1/20 et en déterminant la quantité de glucose formée.

137. — *Purification du glycogène.* Lorsque l'on veut purifier le glycogène provenant soit des mollusques, soit du foie, on le redissout dans le plus petit volume possible d'eau chaude (à 50-60°), on refroidit et on ajoute, pour 100 centimètres cubes de solution, 10 grammes d'iodure de potassium cristallisé et 5 centimètres cubes de lessive de potasse à 60 $^0/_0$. Après avoir mélangé, on précipite le glycogène par addition de 50 centimètres cubes d'alcool à 96°. Le précipité est essoré, lavé avec un mélange de 50 centimètres cubes d'alcool, 100 centimètres cubes d'eau, 5 centimètres cubes de lessive de potasse à 60 $^0/_0$ et 10 grammes d'iodure de potassium, puis essoré complètement. On redissout dans l'eau, on neutralise par l'acide acétique, on reprécipite par l'alcool, puis on essore. On lave successivement à l'alcool à 60°, à 75°, à 90°, et on finit par

un lavage à l'alcool à 96°. On fait sécher la poudre blanche dans l'exsiccateur à acide sulfurique, à la température ordinaire.

138. — *Recherche du glycogène dans la levure.* Une culture de levure dans du moût de bière, âgée de vingt-quatre à quarante-huit heures, renferme des cellules riches en glycogène ; si on examine une goutte de culture au microscope et que l'on fasse tomber au bord de la lamelle une goutte de solution d'iode, celle-ci diffuse dans le liquide et, au bout de quelques instants, on voit le contenu des cellules se colorer plus ou moins en rouge brun, par suite de la présence du glycogène.

Hydrolyse de l'ivoire végétal

139. — L'amande de *Phytelephas macrocarpa* (palmier), provenant d'Amérique et utilisée sous le nom d'ivoire végétal ou corrozo, est formée presque exclusivement de mannocellulose. Par ébullition avec les acides étendus, cette substance se transforme en mannose ; elle s'hydrolyse moins facilement, toutefois, que l'amidon et le glycogène.

Pour opérer cette transformation, on fait bouillir 5 grammes de sciure de corrozo avec 50 centimètres cubes d'une solution au 1/20 d'acide chlorhydrique (à 22° B.), dans un petit ballon muni d'un réfrigérant ascendant et disposé sous la hotte. Après une à deux heures au moins d'ébullition, on caractérise et on sépare le mannose formé à l'état de mannose-hydrazone.

Pour cela, on neutralise exactement avec de la soude le liquide filtré et refroidi et on y ajoute 1 à 2 grammes de phénylhydrazine préalablement dissoute dans cinq fois son poids d'acide acétique à 20 %. Par l'agitation, la mannose-hydrazone ne tarde pas à cristalliser. (Pour les caractères, voir § **91**.)

Caractères des gommes solubles

140. — Les gommes solubles, telles que la gomme arabique et la gomme de cerisier, sont formées principalement de polysaccharides élevés (arabanes, galactanes).

Leur solution aqueuse est plus ou moins épaisse; elle ne se colore pas par l'iode et précipite en gros flocons blancs par l'alcool ou l'acétate de plomb. Si on l'additionne de 5 % d'acide chlorhydrique et que l'on fasse bouillir, on obtient un mélange de sucres réducteurs, parmi lesquels se trouvent principalement l'arabinose et le galactose.

Par oxydation nitrique, les gommes donnent facilement naissance à de l'acide mucique, qui est souvent mélangé d'une petite quantité d'oxalate de calcium, dont on peut le séparer par dissolution dans l'ammoniaque (voir § **101**).

Dissolution de la cellulose

141. — On étudiera les caractères de la cellulose sur du papier Berzélius ou sur du coton hydrophile.

La cellulose est insoluble dans tous les dissolvants habituels et résiste très longuement à l'hydrolyse par les acides étendus et bouillants. Elle n'est guère dissoute que par l'acide sulfurique, le réactif de Schweitzer[1], ou l'action successive de la soude et du sulfure de carbone.

La solution de cellulose dans le réactif de Schweitzer est sirupeuse ; quand on la verse dans un excès d'eau acidulée, la cellulose se précipite en flocons blancs, retenant énergiquement les dernières traces de cuivre

142. — Pour obtenir la dissolution de la cellulose à l'état de thiocarbonate, on plonge du coton hydrophile, 3 grammes par exemple, dans un excès de soude à 15 %, contenu dans un verre à pied taré, puis on l'exprime fortement, avec un agitateur gros et court, de manière à ce qu'il ne retienne plus que trois fois environ son poids de solution. On l'introduit ensuite dans un flacon bouché, avec 1 centimètre cube de sulfure de carbone. Après un repos de trois heures à la température ordinaire, on ajoute assez d'eau pour recouvrir la masse, et on abandonne encore quelques heures (jusqu'au lendemain) pour que la dissolution s'effectue. En agitant, on obtient un liquide homogène que l'on peut diluer à volonté. Ainsi préparée, la solution est jaune ; cette coloration est due à des produits

---

[1] Le réactif de Schweitzer se prépare en faisant barboter pendant plusieurs heures un courant d'air dans de l'ammoniaque placée dans un flacon garni de tournure de cuivre. On arrête l'opération lorsqu'une bande de papier à filtrer, plongée dans un peu du liquide bleu, s'y dissout presque instantanément.

secondaires (trithiocarbonates). La réaction est la suivante :

$$C^6H^{10}O^5 + NaOH + CS^2 = \begin{matrix} C^6H^9O^5 \\ NaS \end{matrix} \diagup CS + H^2O.$$

Réactions colorées de la cellulose

143. — La cellulose gonflée par l'action de certains réactifs, tels que l'acide sulfurique ou la solution concentrée de chlorure de zinc, fixe l'iode et se colore en bleu comme l'amidon.

Pour obtenir la réaction, on verse quelques gouttes de solution d'iode dans l'iodure de potassium sur une bande de papier à filtre placée dans une soucoupe de porcelaine, en évitant un excès. On verse ensuite sur le papier de l'acide sulfurique légèrement étendu (2 parties d'acide à 66° B. et 1 partie d'eau) et froid. Les parties imprégnées d'iode prennent une coloration bleue.

144. — *Préparation du chloroiodure de zinc.* On peut remplacer l'acide sulfurique par une solution concentrée d'acide phosphorique ou de chlorure de zinc. Pour les recherches microchimiques, on utilise habituellement un réactif connu sous le nom de chlorure de zinc iodé, au contact duquel la cellulose se colore immédiatement en bleu intense.

Pour préparer le chloroiodure, on prend 25 à 50 centimètres cubes d'une solution sirupeuse de chlorure de zinc (à 45° B.), on y ajoute un peu d'iodure de potassium cristallisé (1 à 2 grammes) et quelques cristaux d'iode. On chauffe à feu nu, en agitant de manière à

concentrer peu à peu la solution. De temps en temps, on prélève une goutte de mélange que l'on dépose sur une feuille de papier à filtrer. Lorsque la concentration est suffisante, il se produit presque aussitôt une tache bleue intense. Si la coloration tarde à se produire, on continue un peu l'évaporation. On ne doit pas trop concentrer, car le réactif perdrait son action colorante et il faudrait la rétablir par addition d'un peu d'eau. Le réactif agit plus énergiquement à chaud qu'à froid.

Hydrolyse de la cellulose

145. — La cellulose est difficilement hydrolysée par les acides étendus et bouillants, à moins d'avoir été préalablement dissoute dans l'acide sulfurique concentré. Elle est alors transformée en glucose (Braconnot).

On mélange dans un petit ballon 25 grammes (soit 14 centimètres cubes) d'acide sulfurique concentré et $8^{cm3},5$ d'eau, on laisse refroidir, on transvase dans un verre et on introduit 5 grammes de papier à filtre en petits morceaux. Quand on a obtenu, par agitation, un mélange homogène, on ajoute un demi-litre d'eau et on fait bouillir pendant une ou deux heures. On vérifie que le liquide devient fortement réducteur.

(Avoir soin de neutraliser avant d'ajouter la liqueur de Fehling.)

Réactions microchimiques des tissus végétaux

146. — *Caractérisation des tissus cellulosiques et ligneux.* On dépose une coupe mince de racine ou de

tige dans une goutte de chloroiodure de zinc placée sur une lame, on recouvre avec une lamelle, et on examine au microscope.

La cellulose se colore rapidement en bleu, les tissus lignifiés en jaune.

On peut aussi plonger la coupe dans un peu d'acide chlorhydrique concentré contenant en dissolution quelques millièmes d'orcine, de phloroglucine ou de vanilline (un fragment du phénol gros comme une tête d'épingle pour 2 à 3 centimètres cubes d'acide chlorhydrique). On a une coloration presque instantanée des tissus lignifiés, en bleu violet avec l'orcine, en rouge vif avec les deux autres réactifs.

147. — *Teinture double par le carmin et le vert malachite.* La coupe est plongée pendant quelques instants dans une solution d'un hypochlorite alcalin (eau de Javel). Il se dégage de petites bulles de gaz. On agite ; après quelques minutes, on lave à l'eau distillée, puis on plonge dans une solution de carmin aluné [1], additionnée d'une *petite* quantité de vert malachite (solution de vert à 10 $^0/_0$ dans l'alcool à 95°). Pour obtenir cette coloration, on place dans un verre de montre 20 gouttes environ de carmin et 1 à 2 gouttes de vert malachite. Au bout d'un temps assez court, une minute par exemple, on retire la coupe, on la lave

---

[1] Le carmin aluné se prépare en faisant bouillir pendant dix à vingt minutes 1 gramme de carmin pulvérisé avec 1gr,5 d'alun ordinaire et 100 centimètres cubes d'eau, dans un petit matras. On filtre après refroidissement et on ajoute une goutte de phénol pour assurer la conservation de la solution.

à l'eau dans un verre de montre pour enlever l'excès de colorant, et on examine au microscope. Les tissus lignifiés sont colorés en vert, les tissus cellulosiques en rouge. Si les colorations sont insuffisantes, on replonge la coupe dans le bain colorant pendant quelques instants.

CHAPITRE VI

GLUCOSIDES

Préparation de l'amygdaline

148. — L'amygdaline est un glucoside contenu dans les cotylédons de l'amande amère, de l'abricot, de la pêche, etc. On l'extrait habituellement des amandes amères.

On commence par décortiquer 100 grammes d'amandes en les plongeant pendant une à deux minutes dans l'eau bouillante et les pressant ensuite entre les doigts. On les coupe alors en fragments que l'on fait tomber dans 100 centimètres cubes d'alcool à 90°, contenus dans un ballon et portés à l'ébullition sur le bain-marie. Cette opération a pour but de détruire la diastase qui pourrait sans cela décomposer partiellement le glucoside. On bouche le ballon avec un bouchon de liège portant un long tube de verre qui sert de réfrigérant et on maintient une douce ébullition pendant dix minutes, afin de dissoudre l'amygdaline. On décante l'alcool, on fait tomber les amandes sur une toile et on les exprime fortement à la main.

La masse est remise dans le ballon avec 50 centi-

mètres cubes d'alcool à 90° et épuisée de nouveau par chauffage à l'ébullition, pendant dix minutes. On décante l'alcool et on exprime le résidu.

Les liquides alcooliques réunis, rendus troubles par une certaine quantité d'huile qui s'est dissoute pendant le chauffage, sont refroidis complètement. On les passe à travers un filtre à plis mouillé au préalable, afin de retenir l'huile, et on les recueille dans un ballon de 500 centimètres cubes. On distille ensuite dans le vide.

149. — *Distillation dans le vide.* Pour effectuer cette opération, on ferme le ballon B [1] avec un bouchon de caoutchouc portant un gros tube de verre M muni d'une tubulure latérale qui est reliée à un réfrigérant R. Tous les joints doivent être faits avec des bouchons ou des tubes de caoutchouc. A sa partie supérieure, le tube M porte un bouchon traversé par un tube de verre étroit, dont la pointe effilée pénètre dans le ballon jusqu'à un demi-centimètre du fond. Ce tube est muni d'un morceau de caoutchouc à vide que l'on peut boucher au moyen d'une courte baguette de verre ; il permet une très légère rentrée d'air dans le ballon, ce qui facilite l'ébullition. Le réfrigérant porte à sa partie inférieure un tube à entonnoir coudé T, adapté sur une fiole conique tubulée F, en verre épais, de 300 à 400 centimètres cubes de capacité (*fig.* 20).

L'appareil étant monté, le ballon disposé dans le

---

[1] On doit choisir un ballon d'épaisseur bien régulière et ne jamais utiliser, pour distiller dans le vide, des matras à fond plat dont la résistance est insuffisante.

bain-marie qui servira à le chauffer, on relie la tubulure de la fiole F à la trompe au moyen d'un tube de caoutchouc épais, et on fait le vide. On vérifie que les joints tiennent bien en interrompant après quelque temps la commmnication avec la trompe et examinant le manomètre ; le niveau du mercure dans celui-ci ne doit pas varier sensiblement pendant quelques minutes.

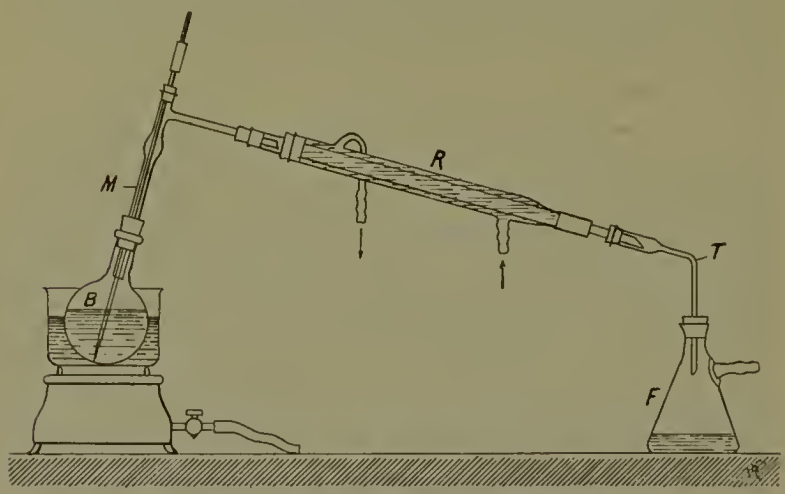


Fig. 20. — Distillation dans le vide.

On procède alors à la distillation. Pour cela, le vide étant fait aussi complètement que possible, on chauffe doucement le bain-marie et on fait passer l'eau dans le réfrigérant. Lorsque la distillation commence, il s'élève souvent une mousse abondante ; celle-ci disparaît, en général, assez rapidement, et la distillation se poursuit d'une manière régulière. Si la mousse menaçait de passer dans le réfrigérant, on pourrait la faire tomber au moyen d'une très légère rentrée d'air par le tube effilé, combinée au besoin avec le refroidissement du bain-marie.

Enfin, si ces moyens ne suffisaient pas, on pourrait introduire quelques gouttes d'huile, avec une pipette, par le tube effilé.

Quand la distillation est terminée, on laisse rentrer l'air en retirant la baguette de verre qui ferme le tube effilé, on ferme le robinet de la trompe, et on détache le ballon de l'appareil.

150. — *Cristallisation de l'amygdaline.* Le sirop qui reste au fond du ballon est agité avec 10 centimètres cubes d'éther, pour enlever l'huile restante ; on décante la solution éthérée, le sirop visqueux restant dans le ballon, et on répète ce lavage deux ou trois fois. La cristallisation commence souvent pendant cette opération. Sans s'en préoccuper, on fait couler le sirop dans une capsule de porcelaine, on rince le ballon avec quelques centimètres cubes d'alcool chaud qu'on ajoute au sirop, et on abandonne au frais pendant quelques jours. L'amygdaline cristallise.

Pour la purifier, on délaie la masse dans un peu d'éther et on l'essore à la trompe, sur une plaque de porcelaine (voir § **124**). Finalement, on lave encore avec un peu d'éther, on essore et on fait sécher à la température ordinaire.

Dédoublement de l'arbutine

151. — L'arbutine se dédouble par hydrolyse en une molécule de glucose et une molécule d'hydroquinone :

$$C^{12}H^{16}O^{7} + H^{2}O = C^{6}H^{12}O^{6} + C^{6}H^{4}(OH)^{2}.$$

On effectuera ce dédoublement en chauffant au bain-marie, dans un tube à essai, 0gr,50 de glucoside avec 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 5 %, pendant une heure.

152. — *Extraction de l'hydroquinone.* Le diphénol formé peut être extrait au moyen de l'éther. Pour cela, on refroidit, on verse dans une petite boule à décantation, et on agite le liquide avec 10 centimètres cubes d'éther. En laissant reposer un instant, les deux liquides se séparent ; la couche inférieure est une solution acide de glucose, la couche surnageante une solution éthérée d'hydroquinone. En manœuvrant le robinet avec précaution, on décante la solution sucrée dans le tube à essai, et la solution éthérée dans une capsule en verre à parois verticales. Pour extraire la totalité de l'hydroquinone, dont une petite partie est restée dans le liquide aqueux, on épuise celui-ci une seconde fois avec la même quantité d'éther. On réunit le deuxième extrait éthéré au premier.

On fait évaporer l'éther à la température ordinaire ou sur un bain-marie légèrement chauffé (ne pas oublier que les vapeurs d'éther sont *très* inflammables) ; l'hydroquinone cristallise en longues aiguilles blanches. On peut la caractériser en la dissolvant dans 1 centimètre cube d'eau et ajoutant goutte à goutte une solution étendue de chlorure ferrique. Il se produit une coloration rose, à laquelle succède un précipité de quinhydrone, formé de lamelles cristallines vert foncé à reflets métalliques. On perçoit en même temps une odeur caractéristique de quinone. Un excès de chlorure ferrique ne donnerait que de la quinone.

153. — On peut caractériser, d'autre part, le glucose dans la solution aqueuse à l'état de glucosazone. Pour cela, on ajoute à 10 centimètres cubes de cette solution $0^{gr},5$ d'acétate de sodium et quelques gouttes de phénylhydrazine, puis on chauffe au bain-marie. Après une demi-heure environ, on voit déjà apparaître les premiers cristaux d'osazone. (Pour les caractères de celle-ci, voir § **93**.)

CHAPITRE VII

ACIDES DE LA SÉRIE GRASSE

Caractères des acides de la série acétique

154. — Les acides saturés de la série acétique possèdent la formule générale $C^{n}H^{2n}O^{2}$. Les premiers termes, jusqu'en C^{10}, sont liquides et entraînables par la vapeur d'eau ; ils sont habituellement compris sous la désignation d'*acides volatils*.

Les solutions neutres de leurs sels de sodium donnent avec le nitrate d'argent des précipités blancs.

155. — Avec le chlorure ferrique, ces acides donnent des sels colorés en rouge brun. Les sels de fer des trois premiers acides sont solubles dans l'eau, de sorte que les solutions de formiate, acétate et propionate de sodium, additionnées de chlorure ferrique, se colorent en rouge. La teinte vire au jaune par l'acide chlorhydrique (différence avec le sulfocyanate).

A partir de l'acide butyrique inclusivement, les sels ferriques forment des précipités bruns, insolubles dans l'eau, solubles dans l'éther (H. Agulhon).

156. — Les sels cuivriques de ces acides présentent à peu près les mêmes caractères de solubilité dans l'eau et dans l'éther que les sels ferriques.

157. — Chauffés avec un peu d'alcool et d'acide sulfurique concentré, les acides volatils (ou leurs sels de sodium) donnent naissance à des éthers qui possèdent des odeurs caractéristiques. La formation de ces éthers peut servir à les reconnaître, en opérant par comparaison avec les acides purs.

Caractères de l'acide formique

158. — Une solution d'acide formique, neutralisée exactement par la soude, donne avec le nitrate d'argent un précipité blanc de formiate d'argent, noircissant par le chauffage (il y a réduction et dépôt noir d'argent métallique).

159. — L'acide formique ou les formiates réduisent facilement l'acide chromique en solution nitrique. Si on ajoute à 3 ou 4 centimètres cubes d'une solution de bichromate de potassium à 0,5 % dans l'acide nitrique à 36° B. une goutte d'acide ou quelques cristaux de formiate, on obtient, après quelques instants, à froid, une coloration bleu violet, due à la formation de nitrate de chrome. Les autres acides volatils ne donnent pas cette réaction.

160. — Par l'acétate neutre de plomb, cette solution donne un précipité blanc cristallin de formiate de

Détermination des acides gras volatils

Liquides plus ou moins solubles dans l'eau, facilement entraînés par la vapeur d'eau. Leurs sels alcalins donnent avec le nitrate d'argent des précipités peu solubles.

Le sel d'argent noircit, plus rapidement à chaud ; la solution primitive donne avec la solution de bichromate de potassium dans l'acide nitrique une coloration bleue..... *Acide formique.*

Les autres acides peuvent être différenciés par les réactions suivantes (H. Agulhon) :

A la solution du sel sodique[1] on ajoute 1 volume d'éther, puis goutte à goutte en agitant, une solution à 2 % de sulfate de cuivre. L'éther	reste incolore	la solution primitive est additionnée de 1 volume d'éther acétique et, goutte à goutte, de solution de chlorure ferrique à 5 %. L'éther	reste incolore.....	*Acide acétique.*
			se colore en jaune...	*Acide propionique.*
	se colore en bleu	la solution primitive est additionnée de 1 volume de benzène et, goutte à goutte, de solution de sulfate de cuivre à 2 %. Le benzène	reste incolore.....	*Acide butyrique.*
			se colore en bleu....	*Acide valérique.* *Acide caproïque.*

[1] Solution à 1 % environ, neutre à la phtaléine.

plomb, soluble à chaud, cristallisant par refroidissement en petites aiguilles très brillantes.

Caractères de l'acide acétique

161. — Une solution pas trop étendue d'acétate de sodium donne avec le nitrate d'argent un précipité blanc cristallin d'acétate d'argent peu soluble à froid, se dissolvant à chaud, et cristallisant facilement par refroidissement en aiguilles blanches.

162. — Un petit fragment d'acétate de sodium sec, chauffé avec $0^{cm3},5$ d'alcool à 95° et 10 à 20 gouttes d'acide sulfurique concentré, donne une odeur nette d'éther acétique (eau-de-vie de cidre), que l'on perçoit beaucoup mieux si on ajoute un peu d'eau (pour supprimer l'odeur de l'alcool en excès).

163. — Un fragment d'acétate de sodium sec, gros comme une tête d'épingle, chauffé avec une quantité égale d'anhydride arsénieux pulvérisé, donne naissance à une odeur alliacée caractéristique d'oxyde de cacodyle. Cette réaction est très sensible ; elle n'est nullement spécifique, les sels des autres acides volatils donnant des produits d'odeur analogue.

Caractères de l'acide butyrique

164. — L'odeur de l'acide butyrique est très spéciale (beurre rance). Ses solutions étendues, neutralisées à la phtaléine, donnent avec le sulfate de cuivre un précipité

bleu clair, soluble en bleu dans l'éther, insoluble dans le benzène (H. Agulhon).

165. — En chauffant une goutte d'acide butyrique avec $0^{cm3},5$ d'alcool à 96° et 10 gouttes d'acide sulfurique concentré, on obtient une odeur de butyrate d'éthyle caractéristique (ananas).

Caractères de l'acide oxalique

166. — Neutralisée exactement par l'ammoniaque, la solution d'acide oxalique donne avec le chlorure de

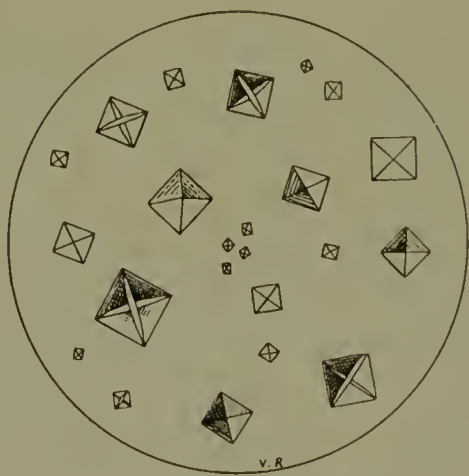


Fig. 21. — Oxalate de calcium.

calcium un précipité blanc insoluble en solution neutre ou alcaline, insoluble dans l'acide acétique, soluble dans les acides minéraux pas trop dilués. Par calcination, ce précipité laisse un résidu de carbonate calcique.

Si on dissout le précipité amorphe d'oxalate de cal-

cium dans la quantité juste nécessaire d'acide chlorhydrique à 1/10, en opérant à l'ébullition, on obtient une liqueur limpide qui donne par refroidissement, après quelques heures, un dépôt d'oxalate calcique cristallisé en octaèdres réguliers (*fig.* 21). On examinera ceux-ci au microscope (oc. 2, obj. 8).

167. — *Application : recherche de l'acide oxalique dans les feuilles d'oseille.* Broyer et exprimer 200 grammes de feuilles d'oseille, porter le jus à l'ébullition pour coaguler les substances protéiques, filtrer, et dans le liquide précipiter l'acide oxalique par le chlorure de calcium en présence d'acide acétique.

Caractères de l'acide succinique

168. — L'acide succinique cristallise de sa solution éthérée en prismes fusibles à 185°. Ces cristaux, chauffés au-dessus de leur point de fusion dans une petite capsule de porcelaine, se volatilisent entièrement, en donnant des vapeurs blanches extrêmement irritantes.

169. — Si on place un cristal d'acide succinique dans un verre de montre avec quelques gouttes d'eau ammoniacale, on obtient, en évaporant à sec pour chasser l'excès d'ammoniaque et reprenant par un peu d'eau, une solution dans laquelle quelques gouttes de chlorure ferrique produisent un abondant précipité gélatineux, couleur d'ocre, de succinate de fer.

Caractères de l'acide lactique

170. — L'acide lactique se présente ordinairement

sous la forme d'un liquide épais, très soluble dans l'eau. L'éther l'enlève assez facilement à ses solutions aqueuses, par agitation. Il n'est pas entraîné par la vapeur d'eau et se distingue ainsi des acides volatils [1].

171. — Si on ajoute à 10 centimètres cubes de solution d'acide lactique ou d'un lactate 1 centimètre cube d'acide sulfurique à 10 %, et si on verse peu à peu, dans le liquide porté à l'ébullition, une solution de permanganate de potassium à 2 %, on transforme presque quantitativement l'acide lactique en aldéhyde ordinaire.

Si on plonge dans l'axe du tube un agitateur mouillé avec une goutte de nitrate d'argent ammoniacal, on voit se former sur l'agitateur un dépôt noir, dû à l'argent réduit par l'aldéhyde. Celui-ci se reconnaît également à son odeur caractéristique (voir § **504**).

172. — *Réaction de Hopkins.* A une goutte d'acide lactique (ou à quelques gouttes de solution alcoolique de cet acide), placée dans un tube à essai *bien sec*, ajouter 5 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré et 3 gouttes de solution saturée de sulfate de cuivre. Agi-

---

[1] On indique souvent, pour distinguer l'acide lactique, la réaction d'Uffelmann. Si on verse dans un verre 10 centimètres cubes de solution aqueuse de phénol à 1 %, puis quelques gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique, on a une coloration bleu violacé. Pour faire la réaction, on verse dans le liquide bleu une goutte ou deux de la solution acide : les acides minéraux décolorent complètement, si la quantité ajoutée est suffisante, tandis que l'acide lactique fait virer la teinte du bleu au jaune.

Cette réaction n'est nullement spécifique ; elle est donnée également par les acides oxalique, tartrique, malique et un grand nombre d'autres acides organiques.

ter, plonger dans un bain-marie d'eau bouillante pendant cinq minutes. Refroidir alors rapidement et ajouter 2 gouttes d'une solution alcoolique très diluée (2 grammes par litre) de thiophène. Agiter et chauffer légèrement de nouveau ; il se forme une coloration rouge cerise.

Cette réaction paraît être donnée par tous les acides-alcools contenant une fonction alcool primaire ou secondaire, mais non tertiaire ; c'est ainsi qu'avec les acides glycolique, malique ou gluconique on a une coloration rose, beaucoup moins intense qu'avec l'acide lactique ; l'acide glycérique donne une teinte marron, l'acide tartrique une coloration d'un violet sale.

Quant à l'acide citrique, qui ne contient qu'un C.OH tertiaire, il ne donne aucune coloration, pas plus que l'acide succinique, qui ne contient aucun OH alcoolique. Les acides-phénols (acide salicylique) se comportent comme les alcools tertiaires.

Il en résulte que la réaction peut très bien être appliquée à la recherche de l'acide lactique dans les tissus animaux, par exemple, où ne se rencontrent pas les acides organiques cités plus haut qui donnent une coloration analogue (P. Thomas).

173. — *Formation du lactate de zinc.* Chauffer à l'ébullition 20 centimètres cubes de solution d'acide lactique (à 10 $^0/_0$ environ) et ajouter par petites portions, en remuant, du carbonate de zinc broyé au mortier, avec un peu d'eau, en pâte claire. Quand la saturation est presque totale, mettre un excès de carbonate et laisser au bain-marie, en agitant souvent, pendant une demi-heure.

Filtrer à chaud; le lactate de zinc cristallise par refroidissement en prismes transparents. Examiner les cristaux au microscope (*fig.* 22).

Le lactate de zinc racémique contient $3H^2O$ et ne

Fig. 22. — Lactate de zinc.

tourne pas le plan de la lumière polarisée, tandis que le lactate actif cristallise avec $2H^2O$ et tourne à droite ou à gauche. L'eau de cristallisation ne disparaît que par chauffage à 110°. Ces caractères permettent de reconnaître la nature de l'acide lactique étudié, dans une fermentation, par exemple.

On a, pour les lactates de zinc :

	Inactif	Actif
Formule.....	$(C^3H^5O^3)^2Zn + 3H^2O$	$(C^3H^5O^3)^2Zn + 2H^2O$
Eau %.....	18,18	12,89
ZnO %.....	27,27	29,03
Solubilité à 15°.	1,67 %	5,70 %
$[\alpha]_D$.....	0	± 9° environ

Caractères de l'acide malique

174. — L'acide malique cristallisé, chauffé à sec dans un tube à essai, fond, puis se décompose en dégageant de l'eau et des fumées blanches d'acide maléique, qui se condensent sur les parois froides sous forme de jolies aiguilles blanches.

175. — Une solution d'acide malique ou de malate alcalin, additionnée d'eau de chaux en excès (jusqu'à réaction nettement alcaline), ne donne aucun précipité. Si on fait bouillir, le liquide reste limpide, à condition que l'eau de chaux ait été saturée à chaud et non à froid (la chaux est moins soluble à chaud qu'à froid). Cette réaction différencie l'acide malique de l'acide tartrique, qui précipite à froid, et de l'acide citrique, qui précipite à l'ébullition par l'eau de chaux.

Caractères de l'acide tartrique

176. — Une goutte de solution étendue d'acide tartrique ou d'un tartrate (à 1 ou 2 grammes par litre), placée dans un tube à essai avec deux gouttes d'une solution de résorcine à 2 $^0/_0$ et 3 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré, donne un liquide qui se colore par chauffage en rose, puis en rouge violet. Il ne faut pas atteindre la température à laquelle l'acide commence à donner des fumées blanches, car la couleur passe alors au brun et disparaît, surtout si la solution dans laquelle on recherche l'acide tartrique est trop diluée.

On obtient encore une teinte rose sensible avec 1/100 de milligramme d'acide tartrique; les autres acides-alcools, lactique, malique, citrique, ne donnent dans ces conditions aucune coloration ou seulement une coloration jaune.

177. — *Formation du bitartrate de potassium.* On verse dans un tube à essai 2 à 3 centimètres cubes

Fig. 23. — Bitartrate de potassium.

d'une solution de potasse (au 1/10 par exemple), et on neutralise en présence d'un fragment de papier de tournesol, par une solution d'acide tartrique, versée au moyen d'une pipette graduée ; on note le volume employé pour la neutralisation de la potasse, et on ajoute un égal volume de solution acide. Il se produit assez rapidement, si les liqueurs ne sont pas trop étendues, un précipité blanc cristallin de bitartrate de potassium que l'on examinera au microscope (*fig.* 23). Si la liqueur est trop étendue, on hâte la formation du précipité par addition d'alcool.

178. — Pour caractériser l'acide tartrique dans un liquide, on ajoute à celui-ci, qui ne doit pas être trop étendu, un peu d'acétate de potassium et de l'acide acétique. Il se forme au bout d'un temps variable de petits cristaux prismatiques de tartrate acide de potassium. On favorise beaucoup la formation du précipité en agitant avec une baguette de verre ; les cristaux se déposent d'abord sur les points frottés.

Caractères de l'acide citrique

179. — *Précipitation du citrate de calcium.* Prendre 10 centimètres cubes de jus de citron ou d'une solution d'acide citrique à 5 $^0/_0$, neutraliser avec précaution par une solution concentrée de soude jusqu'à réaction *très légèrement* alcaline au papier de tournesol ; ajouter 5 centimètres cubes de solution de chlorure de calcium à 10 $^0/_0$. Il ne se produit rien ; mais, si on chauffe, il se fait un abondant précipité blanc de citrate tribasique devenu insoluble.

180. — *Réaction de Denigès.* Diluer au 1/50 un centimètre cube de la solution citrique précédente, et ajouter à 5 centimètres cubes de cette dilution 3 centimètres cubes de sulfate mercurique en solution acide [réactif de Denigès[1]), donnant en présence des acétones un précipité blanc]. Le mélange reste limpide, mais si on porte à l'ébullition et que l'on ajoute goutte

---

[1]) La solution de sulfate mercurique se prépare en faisant dissoudre à chaud 50 grammes d'oxyde mercurique (jaune ou rouge) dans un mélange de 200 centimètres cubes d'acide sulfurique pur et de 1 litre d'eau distillée.

à goutte une solution de permanganate de potassium à 2 %, chaque goutte se décolore, puis il se fait un trouble et enfin un précipité blanc. Celui-ci est une combinaison mercurique de l'acide acétone-dicarbonique ayant pris naissance par oxydation de l'acide citrique sous l'action du permanganate :

$$\begin{array}{c} CH^2\text{-}COOH \\ | \\ COOH\text{-}C\text{-}OH \\ | \\ CH^2\text{-}COOH \end{array} + O = \begin{array}{c} CH^2\text{-}COOH \\ | \\ CO \\ | \\ CH^2\text{-}COOH \end{array} + CO^2 + H^2O.$$

181. — *Recherche de l'acide citrique dans le lait.* La réaction précédente peut servir à démontrer la présence de l'acide citrique dans le lait, où il existe en faible quantité (de 1 à 2 grammes par litre).

A 10 centimètres cubes de lait on ajoute 2 centimètres cubes d'une solution fraîchement préparée d'acide métaphosphorique à 5 %, afin de précipiter les substances protéiques. On mélange, on verse 3 centimètres cubes de réactif de Denigès, on agite bien et on filtre. Le liquide filtré limpide est porté à l'ébullition dans un tube à essai et additionné, goutte à goutte, de solution de permanganate de potassium à 2 %. On obtient un trouble, puis un précipité blanc. Il suffit, en général, de 6 à 8 gouttes de permanganate.

Recherche et dosage de l'acide acétique dans le vinaigre

182. — *Recherche.* Distiller 200 centimètres cubes de vinaigre, de manière à recueillir environ les trois quarts du liquide; neutraliser exactement, en se ser-

vant de papier de tournesol comme indicateur, puis évaporer à sec au bain-marie. On se servira du résidu pour vérifier les caractères donnés plus haut.

183. — *Dosage*. Lorsque l'acide acétique à doser est mélangé à d'autres substances acides, comme cela a

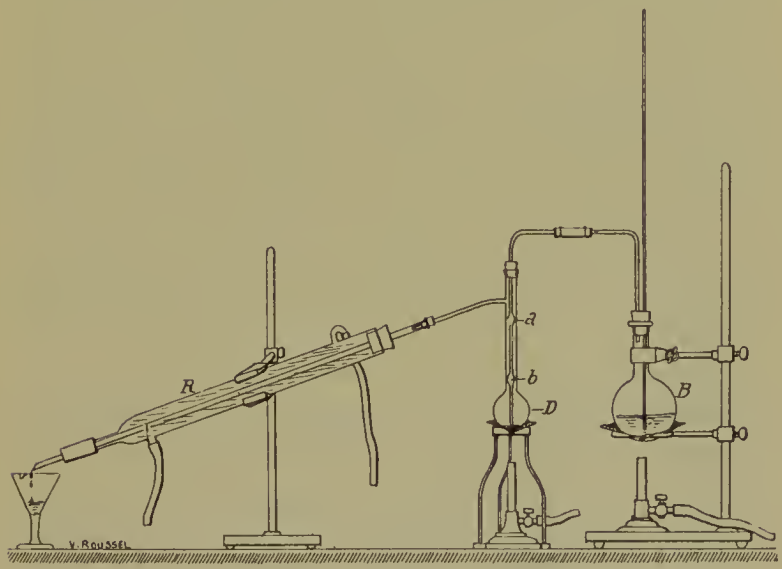


Fig. 24. — Dosage de l'acide acétique.

lieu dans le vinaigre, on l'isole en profitant de ce qu'il est facile de l'entraîner par un courant de vapeur d'eau. On place 10 centimètres cubes de vinaigre dans le petit ballon à distillation D (*fig.* 24), on l'adapte au réfrigérant R, puis on le met en relation avec un ballon B, de 1 litre, contenant de l'eau que l'on porte à l'ébullition. Le courant de vapeur barbote dans le vinaigre et entraîne les acides volatils. On évite l'entraînement du liquide en munissant de deux petites ampoules *a* et *b* le tube qui plonge dans le ballon à distillation.

Il est essentiel de chauffer aussi, au moyen d'une petite flamme, le contenu du ballon D, en réglant la hauteur de la flamme, de manière à ce que *le volume primitif de* 10 *centimètres cubes n'augmente pas* par condensation de la vapeur d'eau venant du grand ballon. Si on néglige cette précaution, l'acide acétique se dilue de plus en plus dans le ballon distillatoire, et l'entraînement est interminable. En opérant bien, on peut terminer le dosage en vingt à trente minutes; on doit recueillir le liquide qui distille dans un verre de 250 centimètres cubes de capacité, ajouter une ou deux gouttes de phtaléine, et titrer, au fur et à mesure de la distillation, avec la soude normale ou N/2. L'opération est terminée lorsque le liquide qui distille n'a plus de réaction acide.

Il est facile de calculer l'acidité. Si on titre avec la soude normale, chaque centimètre cube employé correspond à 60 milligrammes d'acide acétique, et la richesse du vinaigre en grammes par litre est égale à :

$$0{,}060 \times 100 \times n = 6n,$$

n étant le nombre de centimètres cubes employés.

On peut faire un dosage d'acidité directement sur 10 centimètres cubes de vinaigre préalablement étendu de 2 à 3 volumes d'eau, si celui-ci n'est pas trop coloré. Le vinaigre de vin doit avoir une acidité totale supérieure à celle de l'acide acétique qu'il renferme, à cause de l'acide succinique formé pendant la fermentation alcoolique et du bitartrate de potassium préexistant.

Recherche et dosage de l'acide succinique dans un liquide fermenté

184. — On emploiera pour cette recherche la méthode suivante, indiquée par Pasteur. On sait que dans la fermentation alcoolique, la quantité d'acide succinique produit varie de 0,3 à 0,7 $^0/_0$ du sucre fermenté.

Le liquide soigneusement filtré est versé dans une fiole jaugée ; on en prélève exactement 500 centimètres cubes que l'on évapore dans le vide jusqu'à un volume de 10 centimètres cubes environ. On transvase dans une capsule, on rince le ballon à trois reprises avec quelques centimètres cubes d'eau chaude, et on ajoute les eaux de lavage au contenu de la capsule en égouttant bien le ballon à chaque transvasement. La capsule est placée dans un exsiccateur à acide sulfurique dans lequel on fait le vide, et on abandonne jusqu'à complète dessiccation. Le résidu sirupeux est alors traité par 10 centimètres cubes d'un mélange de 1 partie d'alcool à 90 ou 92° et de 1^p,5 d'éther rectifié. On décante le liquide sur un filtre à plis, et on recommence six à sept lavages identiques, en triturant bien chaque fois le résidu, qui de sirupeux devient peu à peu dur et friable. Le liquide éthéro-alcoolique, recueilli dans un ballon, est distillé au bain-marie, pour enlever l'éther, puis neutralisé exactement par de l'eau de chaux bien limpide, en se servant de phtaléine comme indicateur. On transvase dans une capsule, on évapore au bain-marie, et le résidu sec est repris par le mélange alcool-éther qui dissout la glycérine. Le succinate de calcium reste à l'état cristallin, souillé

d'une petite quantité de matière extractive ou d'un sel de chaux à acide incristallisable. Il est facile de débarrasser le succinate de calcium de cette impureté en le faisant digérer dans la capsule même où il se trouve avec de l'alcool à 80°, durant vingt-quatre heures; l'alcool dissout les matières étrangères et laisse intact, cristallisé, presque incolore, le succinate de calcium, qui peut être regardé alors comme suffisamment pur. Recueilli ensuite sur un filtre taré, il est desséché et pesé. Le poids de succinate $C^4H^4O^4Ca + 3H^2O$, multiplié par 0,562, donne l'acide succinique contenu dans la quantité de liquide employée.

Titrage d'une solution d'acide lactique

185. — Les solutions aqueuses d'acide lactique contiennent toujours une certaine quantité d'éther lactyl-lactique :

$$\begin{array}{l} CH^3\text{-}CH\text{-}COOH \\ \quad\quad\;\; | \\ \quad\quad\;\; O\text{-}OC\text{-}CH.OH\text{-}CH^3 \end{array}$$

qui est dû à la réaction mutuelle de 2 molécules d'acide.

L'acidité de ce corps représente environ la moitié de celle de l'acide dont il est formé. Le rapport entre la quantité d'acide libre et celle de l'éther varie avec la concentration et la température ; il y a d'autant moins d'éther que la dilution est plus grande et la température plus élevée. Quand on sature l'acide libre, on détruit l'équilibre, et une partie de l'éther repasse à

l'état d'acide assez rapidement, même à froid. Aussi le titrage de l'acide lactique ne peut-il être fait comme celui des acides ordinaires.

186. — Pour doser l'acidité totale de la solution, on commence par saturer, sur 10 centimètres cubes, l'acidité libre en versant de la soude normale, très rapidement, en présence de phtaléine, de manière à avoir une teinte rose. Celle-ci disparaît d'ailleurs assez rapidement. La quantité de soude x ainsi versée sature l'acide lactique libre ainsi que la fonction acide libre de l'éther lactyl-lactique.

On ajoute alors un excès connu de soude normale, par exemple 5 centimètres cubes, et on chauffe jusqu'au voisinage de l'ébullition pendant cinq minutes afin de saponifier l'éther. Après refroidissement, on détermine l'excès de soude au moyen d'acide sulfurique normal versé jusqu'à disparition de la teinte rose. Comme le virage de la phtaléine est difficile à saisir en passant de la réaction alcaline à la réaction acide, il vaut mieux opérer en sens inverse. Pour cela, après ébullition et refroidissement, on verse 5 centimètres cubes d'acide sulfurique normal correspondant exactement aux 5 centimètres cubes de soude ajoutés ; on laisse ensuite tomber peu à peu, en agitant, de la soude normale contenue dans la burette jusqu'à faible coloration rose persistante. Cette dernière quantité y correspond à l'acide lactique mis en liberté par saponification de l'éther.

La quantité d'éther est donc, en grammes par litre, de :

$$y \times 0{,}162 \times 100,$$

le poids moléculaire de l'éther étant 162, et la quantité d'acide libre est :

$$(x - y) \times 0{,}09 \times 100,$$

le poids moléculaire de l'acide lactique étant 90.

La quantité totale d'acide lactique libre ou éthérifié est :

$$(x + y) \times 0{,}09 \times 100.$$

En raison de l'instabilité du virage obtenu à froid, le dosage de l'acide total peut seul être considéré comme exact.

Recherche et dosage de l'acide tartrique dans le vin

187. — L'un des procédés les plus exacts est celui qui a été indiqué d'abord par Pasteur et perfectionné par Magnier de la Source. On concentre le vin à un petit volume, on laisse cristalliser le bitartrate de potassium, et on recueille les cristaux en les débarrassant des matières étrangères par lavage. On peut ensuite peser le sel après l'avoir desséché, ou mieux en doser l'acidité par une liqueur alcaline titrée.

On opère de la manière suivante : on mesure exactement 50 centimètres cubes de vin que l'on verse dans une capsule de porcelaine, on ajoute 4 centimètres cubes d'une solution de bromure de potassium à 10 $^0/_0$, et on évapore à consistance de sirop clair. On abandonne pendant quatre ou cinq jours, après avoir couvert la capsule. Après ce temps, la cristallisation

du bitartrate de potassium est complète ; on délaie la bouillie cristalline dans 10 centimètres cubes environ d'une solution saturée de bitartrate de potassium dans l'alcool à 40° et on décante le liquide de lavage sur un filtre, de façon à entraîner les cristaux le moins possible. On répète trois fois ce lavage, de manière à enlever totalement la matière colorante, et on décante aussi complètement que possible.

On lave le filtre à l'eau bouillante pour dissoudre la petite quantité de sel qu'il peut renfermer, et on reçoit le liquide chaud dans la capsule qui renferme la plus grande masse des cristaux, de manière à dissoudre ceux-ci. On ajoute une goutte de phtaléine et, dans le liquide maintenu tiède, on verse de l'eau de baryte titrée jusqu'à virage au rose. On peut aussi effectuer le titrage avec de la soude décime, à condition d'opérer à l'ébullition, pour éviter l'influence de l'acide carbonique que peut renfermer la liqueur alcaline, et on emploie alors le tournesol comme indicateur. Chaque centimètre cube de soude décime correspond à $0^{gr},0188$ de bitartrate.

CHAPITRE VIII

PHÉNOLS ET ACIDES AROMATIQUES

Coloration des phénols avec le chlorure ferrique

188. — La plupart des composés phénoliques donnent en solution aqueuse ou alcoolique neutre des colorations intenses avec le chlorure ferrique ; ces colorations sont généralement bleues, vertes, violettes ou rouges et disparaissent avec un excès de réactif. Pour les produire, on devra donc se servir d'une solution très étendue de perchlorure de fer, qu'on ajoutera goutte à goutte avec précaution. On observera surtout la teinte produite au début.

On obtient dans ces conditions les colorations suivantes, avec des solutions aqueuses :

Phénol ordinaire....	bleue
Crésols.....	id.
Pyrocatéchine	verte
Résorcine.....	bleu violacé
Hydroquinone.....	précipité vert foncé de quinhydrone
Orcine	bleu violacé
Phloroglucine... ...	id.
Acide salicylique....	violet intense
Adrénaline	verte
Morphine.....	bleu foncé
Acide gallique.....	noir bleu

Le gaïacol donne en solution aqueuse une coloration rouge plus ou moins fugace, due à la formation de tétragaïacoquinone ; en solution alcoolique, il donne une coloration bleue, passant au vert, puis à l'acajou par addition ultérieure de chlorure ferrique.

De même, le pyrogallol qui, en solution aqueuse, donne une coloration jaune, avec formation d'un précipité rouge brun de purpurogalline, donne en solution alcoolique une belle coloration bleue, qui fonce et passe au noir par addition d'un excès de chlorure ferrique.

Coloration des phénols avec le réactif de Millon

189. — Le phénol ordinaire, les crésols et la plupart des produits phénoliques substitués en ortho, comme l'acide salicylique, ou en para, comme la tyrosine, donnent avec le réactif de Millon, à froid ou en chauffant très légèrement, une coloration rouge intense, qui augmente peu à peu et fait place à un précipité rouge foncé.

Parmi les diphénols, la pyrocatéchine et son dérivé méthylique, le gaïacol, donnent une coloration rouge intense ; la résorcine et l'hydroquinone ne donnent qu'un précipité ou une coloration jaune, qui ne correspondent pas à la réaction de Millon du phénol ordinaire ; l'orcine donne seulement un précipité verdâtre.

Le pyrogallol et la phloroglucine ne donnent pas non plus la réaction de Millon.

Ajoutons qu'avec les naphtols α et β il se fait une coloration orangée suivie de la formation d'un précipité brun ; le phénomène ne correspond pas à la réaction typique de Millon.

Caractères de l'acide benzoïque

190. — L'acide benzoïque est cristallisé en paillettes blanches, nacrées, fondant à 121°,5. Il se sublime avec la plus grande facilité et peut être entraîné avec la vapeur d'eau ; très soluble dans l'eau bouillante, il exige 350 à 400 parties d'eau pour se dissoudre à la température ordinaire.

Pour l'extraire d'une solution quelconque, après avoir acidulé au moyen d'acide sulfurique, on agite avec de l'éther dans une boule à décantation, de la manière indiquée au § **152**. L'acide benzoïque passe avec facilité et en totalité dans ce dissolvant ; il suffit d'évaporer à basse température pour obtenir un résidu cristallisé dans lequel on recherchera l'acide. Celui-ci sera caractérisé par sa solubilité dans l'eau bouillante, d'où il cristallise par refroidissement en belles aiguilles, et par son point de fusion [1].

---

[1] On trouve fréquemment dans les traités l'indication d'une réaction colorée de l'acide benzoïque, à savoir la formation de bleu d'aniline lorsqu'on le chauffe avec une dissolution de fuchsine dans l'aniline. Non seulement l'acide benzoïque n'entre pas dans la molécule du colorant et sert seulement à faciliter la réaction, mais celle-ci se produit aussi facilement en présence d'acides organiques quelconques, acétique, succinique, cinnamique, salicylique. Il s'agit donc là d'une réaction qui n'a absolument rien de spécifique.

Il en est de même de celle qui consiste à nitrer l'acide benzoïque et à réduire le composé nitré par le sulfure d'ammonium, après neutralisation, de manière à obtenir un composé aminé qui se colore en rouge. Cette réaction est donnée par le phénol et de nombreux corps aromatiques.

191. — On peut aussi utiliser la réaction suivante, qui est basée sur la facile transformation de l'acide benzoïque en acide salicylique par oxydation.

A 5 centimètres cubes de solution aqueuse d'acide benzoïque (obtenue en évaporant l'extrait éthéré avec un peu d'eau), on ajoute 1 goutte d'acide acétique cristallisable, 5 gouttes de solution de chlorure ferrique à 10 $^0/_0$ et 5 gouttes d'eau oxygénée à 1 volume. On chauffe peu à peu, et on porte à l'ébullition pendant 10 à 15 secondes. Il se produit une coloration rouge violacé, même lorsque la solution ne contient pas plus de $0^{mgr},5$ d'acide benzoïque.

Caractères de l'acide salicylique

192. — L'acide salicylique se présente sous forme de cristaux blancs, fondant à 156°, aussi peu solubles dans l'eau que l'acide benzoïque; il se dissout dans 12 parties et demie d'eau bouillante et dans 450 parties d'eau froide.

Sa solution aqueuse donne, en présence de chlorure ferrique, une belle coloration violette, due à la présence d'une fonction phénolique.

En chauffant quelques cristaux d'acide salicylique avec 1 centimètre cube d'alcool méthylique et 10 gouttes d'acide sulfurique concentré, on obtient l'odeur caractéristique du salicylate de méthyle (essence de Wintergreen).

Préparation de l'acide salicylique par saponification de l'essence de Wintergreen

193. — Cette essence renferme l'acide salicylique à l'état d'éther méthylique. On peut saponifier le salicylate de méthyle au moyen de la potasse alcoolique, de la manière suivante : on place dans un tube à essai 1 centimètre cube d'essence de Wintergreen [1], une pastille de potasse et 2 centimètres cubes d'alcool qui sert de dissolvant. On chauffe doucement à l'ébullition, que l'on maintient pendant quelques minutes. La saponification étant achevée, on acidifie avec de l'acide chlorhydrique étendu, en présence d'un fragment de papier de tournesol, on fait bouillir un instant pour chasser l'alcool, on refroidit, et on extrait par quelques centimètres cubes d'éther, en suivant la méthode indiquée au § **152**. L'éther recueilli dans une capsule à bords relevés verticalement est évaporé au bain-marie ; l'acide salicylique cristallise en aiguilles blanches.

Caractères des tannins

194. — Les tannins sont des principes immédiats qu'il n'est pas encore possible de définir d'une manière exacte. Ils sont solubles dans l'eau, avec laquelle ils donnent un liquide le plus souvent coloré en jaune, brun ou rouge, précipitant en flocons volumineux la

---

(1) Ou essence de gaultherie (Gaultheria procumbens L.).

solution aqueuse de gélatine et les alcaloïdes (sulfates de quinine, de strychnine, caféine, etc.).

Ils renferment en général plusieurs fonctions phénoliques et jouissent par conséquent des réactions générales des phénols; beaucoup contiennent un ou plusieurs groupements carboxyliques; plusieurs enfin ont la structure d'un glucoside.

En solution alcaline, les tannins absorbent l'oxygène de l'air et se transforment en produits de coloration intense.

La plupart des tannins, en solution aqueuse étendue, donnent avec les oxydases (laccase, tyrosinase, § **431** et suiv.) des colorations foncées généralement rouges ou brunes.

195. — Le tannin de la noix de galle donne avec les sels ferriques très dilués une coloration et un précipité bleu noir intense; avec les sels ferreux, il n'y a pas de précipité, mais le mélange exposé à l'air se colore peu à peu en brun, puis en noir bleuâtre très intense.

D'autres sels métalliques donnent avec ce même tannin des précipités diversement colorés :

Sels de plomb	précipité	blanc
— de cuivre	—	brun
— mercuriques	—	orangé

Parmi les divers tannins que l'on peut extraire du règne végétal, ceux qui dérivent de l'acide gallique donnent, en général, une coloration bleu noir avec le perchlorure de fer (encre); ceux qui dérivent de la pyrocatéchine (café, quinquina, etc.), donnent une coloration verte.

Dosage du tannin dans les matières tannantes

196. — Au point de vue pratique, le caractère fondamental du tannin est sa propriété de se fixer sur la peau en donnant une combinaison insoluble. C'est donc à ce point de vue qu'il est préférable de se placer pour doser, dans les matières tannantes, la proportion de substance fixable sur une certaine quantité de peau pulvérisée. On fait d'abord un extrait aqueux de la substance étudiée; on dose ensuite la matière dissoute, avant et après contact avec la poudre de peau et, par différence, on a le tannin.

On prend une quantité de substance telle qu'elle renferme environ 4 grammes de tannin (1). On la pulvérise et on l'extrait par des portions successives d'eau chauffée vers 45 à 50°. Lorsqu'il s'agit de bois ou d'écorce, difficiles à extraire, on chauffe jusqu'à 80 à 90°. On complète finalement le volume à 1 litre, dans une fiole jaugée et on mélange bien.

On prélève 100 centimètres cubes de liquide non filtré, qui sont détannisés par de la poudre de peau légèrement chromée (2). Pour cela, on fait tremper 10 grammes de cette poudre pendant quinze minutes avec 25 centimètres cubes d'eau, et on ajoute le liquide à

---

(1) On prendra, par exemple, 30 à 36 grammes d'écorce de chêne, 15 à 16 grammes de sumac, 32 grammes d'écorce de pin, 6 grammes de noix de galle, etc.

(2) On pourra se procurer de la poudre de peau convenable pour l'analyse en s'adressant aux diverses écoles de tannerie, à Vienne, à Freiberg, à Leeds, etc.

traiter. Après agitation, on laisse en contact douze heures, on filtre, et on évapore à sec, dans une capsule tarée, 50 centimètres cubes du liquide filtré. On sèche à 100° jusqu'à poids constant; soit p le poids de l'extrait sec.

D'autre part, on filtre le liquide d'extraction à travers un filtre à analyse, en ayant soin de rejeter les 300 premiers centimètres cubes et en ajoutant au besoin un peu de kaolin pulvérisé. On opère ainsi parce que le filtre retient un peu du tannin contenu dans les premières portions du liquide qui le traversent. (On pourra se servir avantageusement comme filtre de la bougie Berkefeld, en utilisant une trompe à eau.)

On recueille ensuite 50 centimètres cubes de liquide limpide que l'on évapore à sec pour avoir le poids de substance dissoute. En retranchant du poids p' trouvé le facteur $p \times 1{,}25$, on a le poids de tannin fixé par la peau, de sorte que l'échantillon analysé renfermait :

$$[p' - (p \times 1{,}25)] \times 20$$

de tannin.

Cette méthode empirique est une simplification de celle qui est employée dans l'industrie ; elle présente l'avantage de donner des résultats très constants, lorsque l'on opère dans des conditions rigoureusement déterminées, dont on trouvera le détail dans les ouvrages spéciaux.

Dosage des sulfoconjugués urinaires

197. — Les composés phénoliques introduits dans l'organisme et ceux qui s'y produisent sont générale-

ment éliminés par l'urine à l'état d'éthers sulfuriques (sulfoconjugués). Il en est de même de l'indol. On peut avoir une idée de la quantité globale de ces corps en dosant l'acide sulfurique qui s'y trouve engagé.

Pour cela, il faut hydrolyser ces combinaisons par chauffage avec un acide et précipiter l'acide sulfurique à l'état de sel de baryum que l'on recueille et que l'on pèse. Dans un essai parallèle, on dose aussi à l'état de sel de baryum les sulfates qui existent normalement dans l'urine; en retranchant cette quantité de la précédente, on obtient le poids de sulfate de baryum correspondant aux sulfoconjugués urinaires.

198. — *Dosage de l'acide sulfurique libre et éthérifié.* Dans un vase de Bohême cylindrique de 150 centimètres cubes, on verse 50 centimètres cubes d'urine filtrée, un égal volume d'eau et 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur à 22° B. On plonge dans l'eau d'un bain-marie et on chauffe pendant cinq heures, le vase étant fermé par un disque de verre pour éviter l'évaporation. On ajoute alors goutte à goutte, en agitant, une solution de chlorure de baryum à 10 $^0/_0$, tant qu'il se fait un précipité (environ 5 centimètres cubes) et on laisse refroidir. On décante le liquide surnageant sur un filtre à analyse, on délaie le précipité dans 100 centimètres cubes d'eau, à laquelle on ajoute 1 centimètre cube d'acide acétique cristallisable, puis on chauffe un instant au bain-marie et on laisse refroidir. On décante alors le liquide sur le filtre et on y fait ensuite tomber le précipité au moyen d'un jet de pissette. Comme le sulfate de baryum adhère aux parois du vase, il faut, pour entraîner les dernières portions,

ajouter quelques centimètres cubes d'eau et frotter la paroi avec un agitateur dont l'extrémité est recouverte d'un petit bout de tube de caoutchouc. On recommence cette opération à deux ou trois reprises, on lave avec peu d'eau, puis on fait sécher en plaçant l'entonnoir avec son contenu dans une étuve à 100°. On détache le précipité du filtre, on incinère ce dernier, on ajoute le précipité, on porte au rouge et, après refroidissement, on mouille les cendres avec une à deux gouttes d'acide sulfurique au 1/10, pour transformer en sulfate le sulfure formé sous l'action réductrice du charbon. On évapore à sec au bain-marie et on porte de nouveau au rouge. On pèse après refroidissement. On a ainsi le poids de sulfate de baryum corespondant aux sulfoconjugués et aux sulfates de l'urine.

199. — *Dosage des sulfates dans l'urine.* Dans un second essai, on dose comparativement les sulfates de l'urine. Pour cela, on chauffe au bain-marie 50 centimètres cubes d'urine filtrée, avec un égal volume d'eau et 1 centimètre cube d'acide acétique cristallisable. On ajoute la solution de chlorure de baryum à 10 $^0/_0$, goutte à goutte, tant qu'il se fait un précipité, on laisse refroidir, on décante le liquide sur un filtre à analyse et on délaie le précipité dans 100 centimètres cubes d'eau, à laquelle on ajoute 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur à 22° B. On chauffe au bain-marie, en agitant de manière à favoriser la dissolution du phosphate de baryum entraîné, on laisse refroidir, puis on décante sur le filtre et on recueille le précipité comme ci-dessus.

Le poids de sulfate de baryum trouvé correspond aux

sulfates de l'urine. En le retranchant du poids obtenu dans la première opération, on a la quantité correspondant aux sulfoconjugués, que l'on rapporte à un litre d'urine. Le poids de sulfate de baryum trouvé, multiplié par 0,3432, donne le poids de SO^3 correspondant.

CHAPITRE IX

MATIÈRES GRASSES ET GLYCÉRINE

Caractères des matières grasses

200. — Les matières grasses peuvent être assez facilement reconnues à leurs caractères physiques. Insolubles dans l'eau, très peu solubles dans l'alcool fort (à l'exception des huiles de ricin et de croton), elles sont solubles en toutes proportions dans l'éther, le pétrole, le benzène, le sulfure de carbone, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme, l'acétone, etc. Celles qui sont liquides (huiles) ou facilement fusibles (beurres) donnent sur le papier des taches translucides persistantes, contrairement aux huiles essentielles, qui donnent des taches de même aspect, mais disparaissant après quelque temps, par évaporation.

Les matières grasses naturelles sont toujours des mélanges de différents glycérides dont les uns dérivent d'acides gras non saturés, oléique, linoléique, etc., les autres d'acides gras saturés, principalement palmitique et stéarique.

201. — Deux réactifs colorants sont surtout employés pour reconnaître les matières grasses dans les coupes, l'acide osmique et l'orcanette. Le premier s'emploie en solution aqueuse à 1 $^0/_0$; il colore les gouttelettes huileuses en noir intense par suite de la réduction de l'acide osmique au contact de l'oléine généralement renfermée dans la graisse. On observera qu'il colore la myéline des nerfs, en raison de la présence dans celles-ci de restes oléiques.

202. — Pour caractériser les matières grasses dans les tissus végétaux, on utilise de préférence l'orcanette acétique[1], dont on recouvre la coupe, placée dans un verre de montre. Les globules gras ou les gouttelettes d'essences se colorent en rouge. Il est facile de différencier les premiers des secondes en traitant préalablement la préparation par de l'alcool à 80°-90°, qui dissout instantanément les essences et n'agit pas sur les corps gras (à l'exception des deux huiles précitées).

Formation des acides gras par saponification du suif

203. — Faire fondre au bain-marie 10 grammes de

---

[1] Pour préparer ce colorant, on épuise 10 grammes de racine d'orcanette pulvérisée, placés dans un tube de verre étiré à un bout et dont l'effilure est garnie d'un tampon de coton hydrophile pas trop serré, au moyen d'alcool à 90°, versé par petites portions, jusqu'à ce que l'on ait obtenu 50 centimètres cubes de teinture, à laquelle on ajoute, d'après Guignard, 5 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable et une dissolution de 32 grammes d'hydrate de chloral dans un poids égal d'eau. On laisse déposer jusqu'au lendemain et on filtre.

suif dans une capsule de porcelaine de 250 centimètres cubes de capacité. Quand la température atteint 90°, ajouter 8 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B., et 5 centimètres cubes d'alcool à 96 centièmes, puis remuer le mélange pendant une minute. Ajouter alors 200 centimètres cubes d'eau bouillante, remuer, porter le mélange à une douce ébullition, en chauffant à feu nu, jusqu'à dissolution complète du savon; éviter la formation d'une mousse trop abondante. Prélever environ 10 centimètres cubes de cette solution que l'on partage dans deux tubes à essai. On vérifiera, d'une part, que le savon est précipité par le chlorure de sodium en solution pas trop diluée; d'autre part, qu'il fournit avec les chlorures de calcium ou de baryum des précipités blancs, insolubles, de savons calcique ou barytique.

Le reste de la dissolution est retiré du feu et additionné, goutte à goutte, en agitant, d'acide chlorhydrique ordinaire jusqu'à ce que la mousse tombe brusquement.

Les acides gras se séparent en flocons. Chauffer à l'ébullition quelques minutes pour les rassembler en une couche huileuse surnageante, et laisser refroidir. On obtient un gâteau cristallisé d'acides gras.

Séparation des acides gras non saturés

204. — Les acides gras liquides, en particulier les acides non saturés, oléique, linoléique, etc., donnent des sels de plomb solubles dans l'éther, alors que ceux

des acides gras solides y sont presque insolubles [1]. On peut les séparer en se basant sur cette propriété.

On saponifie 10 grammes de suif au moyen de 10 centimètres cubes de lessive de soude, comme ci-dessus, mais on ajoute 40 centimètres cubes d'alcool, destinés à dissoudre les savons. Lorsque la saponification est complète, on verse quelques gouttes de phtaléine, et on neutralise par l'acide acétique à 10 $^0/_0$. Le liquide est alors versé dans une solution de 10 grammes d'acétate neutre de plomb dans 500 centimètres cubes d'eau, maintenue en ébullition dans un ballon de 1 litre. Il se fait un précipité de savons plombiques. On refroidit aussitôt le ballon sous un courant d'eau froide, on laisse déposer le précipité, qui adhère aux parois du vase, et on décante le liquide surnageant dès que celui-ci s'est éclairci. On lave à trois reprises avec 100 à 150 centimètres cubes d'eau chaude (à 50-60°), puis on égoutte bien et on enlève au besoin avec un peu de papier à filtrer la petite quantité d'eau restée dans le vase. On verse alors sur le savon 150 centimètres cubes d'éther, on munit le ballon d'un réfrigérant ascendant, et on fait bouillir pendant un quart d'heure sur le bain-marie. On laisse refroidir et on abandonne jusqu'au lendemain. On filtre la solution éthérée et on lui ajoute de l'acide chlorhydrique au cinquième tant qu'il se fait un précipité (50-60 centimètres cubes environ). On dé-

---

(1) La séparation des acides gras solides et liquides n'équivaut pas tout à fait à celle des acides saturés et non saturés, puisque les sels de plomb des acides érucique et élaïdique, qui sont des acides non saturés, sont très peu solubles dans l'éther froid (Lewkowitsch).

cante l'éther, qui renferme en solution les acides liquides, on le lave à l'eau une à deux fois, et on le décante enfin sur un filtre sec. On distille au bain-marie : il reste comme résidu l'acide oléique, sous forme d'un liquide huileux jaune clair.

Lorsqu'on veut éviter toute altération des acides non saturés, on doit opérer la dissolution dans l'éther et la distillation de celui-ci dans un courant de gaz inerte, comme l'anhydride carbonique.

Point de fusion des acides gras

205. — La méthode du bloc Maquenne, décrite au § **96**, convient pour déterminer le point de fusion des matières grasses. Il vaut mieux, dans ce cas, employer le procédé du tube capillaire.

On commence par étirer au chalumeau un tube de verre de 4 à 6 millimètres de diamètre, à parois minces, de façon à avoir une effilure de 1 millimètre de diamètre, que l'on ferme de manière à lui donner une longueur d'environ 10 centimètres. On coupe le tube un peu au-dessus de la partie effilée et on y fait tomber un petit fragment de la substance dont on veut prendre le point de fusion; ce fragment doit pénétrer jusqu'au tiers inférieur de l'effilure. On fixe alors celle-ci contre la tige d'un thermomètre, au moyen de deux petites bagues obtenues en coupant avec des ciseaux l'extrémité d'un tube de caoutchouc.

Le thermomètre est alors suspendu au milieu d'un vase de Bohême d'un demi-litre de capacité, rempli aux 2/3 d'eau distillée et contenant un peu de mercure, en quantité juste suffisante pour couvrir complètement

le fond. Le réservoir du thermomètre doit arriver à quelques centimètres du fond; le tube capillaire, dont la partie supérieure doit rester hors de l'eau, est placé de telle façon que la parcelle de substance soit à peu près au milieu de la longueur du réservoir. Le vase est disposé sur un support, de manière à pouvoir être chauffé. Pour éviter la surchauffe des parois, il est bon de placer entre le fond du vase et la toile métallique un disque de clinquant dont le diamètre soit supérieur d'environ 4 centimètres à celui du vase. Il est bon également de porter l'eau à l'ébullition quelques instants avant l'opération, et de la laisser ensuite refroidir convenablement. On évite ainsi la formation des bulles de gaz qui se déposeraient sur les parois et sur le thermomètre.

Le tout étant mis en place, on chauffe très doucement, de manière à ce que la température s'élève d'environ 1° par minute, lorsqu'on est au voisinage du point de fusion. On observe la substance ; lorsqu'on la voit devenir transparente, on note la température indiquée par le thermomètre.

On peut faire subir au chiffre trouvé une correction, pour la partie de la tige du thermomètre qui ne plonge pas dans le bain. Cette correction est peu importante pour les températures inférieures à 60-70°.

Lorsque les acides ou les corps gras sont de consistance pâteuse, il est impossible d'en faire tomber une parcelle dans l'intérieur du tube capillaire. On fait alors fondre dans une petite capsule un peu de produit et on y plonge le tube effilé dont la pointe a été ouverte. Le liquide y monte par capillarité; on emprisonne ainsi une goutte aussi petite que possible. On ferme

l'extrémité de l'effilure, on attend que la solidification soit totale (souvent plusieurs heures), et on procède comme ci-dessus.

Réactions de la glycérine

206. — *Formation de l'acroléine.* Placer dans un tube à essai une pincée de bisulfate de potassium pulvérisé et y laisser tomber une goutte de glycérine Chauffer jusqu'à formation de fumées blanches. On perçoit l'odeur irritante de l'acroléine (porter aussitôt le tube sous une hotte).

Les vapeurs réduisent le nitrate d'argent ammoniacal [1]. Pour le constater, on trempe l'extrémité d'un agitateur dans le réactif et on l'introduit dans l'axe du tube. Une coloration noire indique la mise en liberté de l'argent réduit. Cette réduction étant favorisée par l'élévation de température, on chauffera le réactif à l'ébullition avant d'en garnir l'agitateur.

207. — *Réaction de la glycérine avec le borax.* La solution de borax, très légèrement alcaline au tournesol, devient nettement acide lorsqu'on y ajoute de la glycérine [2], par formation d'un glycéroborate, sel qui

---

[1] Le nitrate d'argent ammoniacal se prépare en mélangeant volume à volume des solutions de nitrate d'argent (à 1 ou 2 %, d'ammoniaque concentrée et de lessive de soude.

[2] Les sucres réducteurs et les mannites donnent la même réaction. Si l'on voulait rechercher plus exactement la glycérine, il faudrait d'abord la séparer en mettant à profit la propriété qu'elle possède d'être entraînable par distillation avec la vapeur d'eau.

jouit en outre de la propriété de colorer en vert la flamme incolore du bec Bunsen.

Pour effectuer cette dernière réaction, on plonge l'extrémité, façonnée en boucle, d'un fil de platine (ou d'un fil de fer) dans la glycérine ; on prélève ensuite une petite quantité de borax en poudre, en touchant légèrement la surface de ce sel avec la boucle, et on porte dans le *voisinage* de la flamme, vers la base de celle-ci.

208. — *Réactions colorées de la glycérine.* La glycérine, oxydée par l'eau de brome, fournit un mélange de produits réducteurs qui possèdent des réactions colorées caractéristiques (Denigès).

Pour les obtenir, on verse dans un tube à essai 1 centimètre cube d'une solution de glycérine à 5 $^0/_0$ et 10 centimètres cubes d'eau de brome faite avec 3 centimètres cubes de brome pour 1 litre d'eau. On place au bain-marie bouillant pendant vingt minutes, puis on fait bouillir jusqu'à disparition complète du brome en excès et on laisse refroidir.

Dans un tube à essai, on verse $0^{cm3},5$ du liquide obtenu ; on ajoute 2 à 4 gouttes d'une solution alcoolique de codéine à 5 $^0/_0$, puis 2 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré et on place pendant deux ou trois minutes au bain-marie bouillant : il se produit une belle coloration bleu verdâtre.

Si on opère de même sur un second essai, mais en remplaçant la solution de codéine par une solution alcoolique de résorcine à 5 $^0/_0$, on a aussitôt, sans chauffer, une coloration intense rouge vin.

209. — *Recherche de la glycérine dans le vin.* On peut appliquer ces réactions à la recherche de la glycérine dans le vin. On défèque 10 centimètres cubes de vin par addition de 1 centimètre cube de sous-acétate de plomb, on filtre et on agite le liquide filtré avec un peu de sulfate de sodium en poudre, afin de précipiter le plomb en excès. On filtre à nouveau et on chauffe 1 centimètre cube du liquide avec 10 centimètres cubes d'eau de brome, comme précédemment. On fait ensuite les réactions indiquées, soit avec la codéine, soit avec la résorcine.

On peut aussi opérer avec le vin non défèqué au préalable. Pour cela, on évapore au bain-marie 1 centimètre cube de vin jusqu'à consistance de sirop, on délaie le résidu dans 5 centimètres cubes d'eau de brome *saturée*, et on termine comme plus haut. Il faut employer ici une solution plus riche en brome, une partie de celui-ci servant à précipiter les substances tanniques contenues dans le vin.

Détermination de l'indice de saponification

210. — On appelle indice de saponification (ou indice de Köttstorfer) d'une matière grasse le poids de potasse KOH, exprimé en milligrammes, nécessaire pour saturer les acides gras de 1 gramme de matière grasse.

Pour déterminer cet indice, on verse dans une fiole conique de 150 centimètres cubes, exactement tarée, environ 5 centimètres cubes à $5^{cm3},5$ d'huile (ricin, olive, etc.) ou de matière grasse fondue (beurre, suif, etc.) et on détermine exactement le poids p de

matière grasse ajoutée. On ajoute ensuite 25 centimètres cubes d'une solution de potasse alcoolique à peu près normale [1]. On ferme avec un verre de montre et on abandonne à 90° sur le bain-marie bouillant pendant vingt minutes en agitant fréquemment (s'assurer que toute la matière grasse a disparu, par addition d'un peu d'eau, qui ne doit déterminer aucun trouble). On laisse refroidir, on ajoute une goutte de phtaléine et on titre avec l'acide sulfurique normal jusqu'à disparition de la teinte rouge. On opère de même avec 25 centimètres cubes de la solution alcoolique de potasse ; par différence on a le nombre de centimètres cubes d'acide normal correspondant aux acides gras. Ce nombre n donne l'indice cherché au moyen de la formule suivante :

$$I = \frac{n \times 56}{p}.$$

Détermination de l'indice d'iode

211. — Les acides gras non saturés (tels que l'acide oléique) et les glycérides correspondants, peuvent fixer autant de molécules d'iode qu'ils ont de doubles liaisons. On appelle indice d'iode (ou indice de Hübl), le nombre de grammes du métalloïde absorbé par 100 grammes de matière grasse.

Pour déterminer cet indice, on pèse au milligramme,

---

(1) Pour préparer cette solution, on dissout 70 grammes de potasse en plaques dans 25 à 30 centimètres cubes d'eau chaude, on refroidit et on complète à 1 litre avec de l'alcool à 96°. On décante dès que le liquide s'est éclairci.

dans un verre de montre, $0^{gr},3$ environ d'huile ou d'acides gras siccatifs, ou $0^{gr},5$ environ s'il s'agit de produits non siccatifs. On fait passer la matière pesée dans un flacon d'un demi-litre, bouché à l'émeri, en la dissolvant dans 15 à 20 centimètres cubes de chloroforme, on verse la même quantité de chloroforme dans un flacon témoin d'égale capacité, puis on ajoute dans chaque flacon 20 centimètres cubes exactement mesurés de solution d'iode [1] (à 5 $^0/_0$ dans l'alcool à 95°) et 20 centimètres cubes de solution de chlorure mercurique (à 6 $^0/_0$ dans l'alcool à 95°).

On bouche les flacons et, après avoir agité, on abandonne au repos pendant deux heures. Après ce temps, on introduit dans chaque flacon 25 centimètres cubes de solution d'iodure de potassium à 20 $^0/_0$; on agite pendant une à deux minutes, puis on titre l'excès d'iode par l'hyposulfite de sodium N/5 [2]. On verse d'abord celui-ci jusqu'à disparition presque complète de la teinte jaune, puis on continue, avec précaution, en agitant bien après addition de chaque goutte, jusqu'à décoloration complète.

---

[1] La solution d'iode doit être préparée à froid. Pour obtenir une dissolution rapide du métalloïde, on enferme celui-ci dans un petit sachet en étamine que l'on suspend à l'aide d'un fil serré entre le col et le bouchon du flacon, de manière que l'iode soit maintenu à la partie supérieure du liquide.

[2] Pour préparer la solution titrée d'hyposulfite de sodium, on peut se contenter de peser exactement $49^{gr},6$ de ce sel, bien cristallisé et sec, que l'on dissout dans un peu d'eau froide. On amène la solution au volume de 1 litre dans une fiole jaugée. La formule du sel est $S^2O^3Na^2 + 5H^2O$, et le poids moléculaire 248. On a donc ainsi une solution exactement N/5.

L'hyposulfite pour photographie, cristallisé en petits prismes, d'aspect analogue au sucre cristallisé, convient parfaitement.

La différence entre les volumes v et v' d'hyposulfite employés dans le flacon témoin et dans celui qui contenait la matière grasse, exprimée en centimètres cubes et multipliée par $0^{gr},0127$, représente la quantité d'iode fixé par l'essai. Si p est le poids de celui-ci en grammes, l'indice d'iode sera donné par la formule :

$$\frac{v - v'}{p} \times 0{,}0127 \times 100.$$

Dosage de la matière grasse contenue dans une graine

212. — Qu'il s'agisse d'une graine contenant une notable quantité d'huile, comme le colza, l'œillette, l'arachide, le ricin, l'amande, ou de beurre, comme le cacao, le laurier, la muscade, ou bien encore d'une graine pauvre en matière grasse, comme le café, le maïs, etc., on opère exactement de la même manière.

La graine est broyée dans un moulin ; on en prélève un échantillon de 1 à 10 grammes que l'on sèche à l'étuve dans une petite capsule. Après une ou deux heures de séjour à 105-110°, on fait tomber l'échantillon dans une petite allonge de verre dont la douille est garnie d'un tampon d'ouate hydrophile. On lave la capsule à deux ou trois reprises avec de l'éther, du sulfure de carbone, de l'éther de pétrole ou du chloroforme, que l'on verse ensuite dans l'allonge pour épuiser la graine. On continue l'épuisement jusqu'à ce qu'une petite quantité (1 centimètre cube environ) du liquide qui s'écoule de l'allonge, évaporée dans un

verre de montre, ne laisse plus de résidu. On distille alors la solution au bain-marie pour chasser le dissolvant, en opérant dans une capsule tarée à parois verticales. Lorsque le poids est devenu constant, on pèse la matière grasse restée dans la capsule et on rapporte à 100 grammes de graines.

Pour éviter les pertes dues au grimpage de la dissolution pendant l'évaporation au bain-marie, il faut employer des capsules dont la paroi verticale soit assez haute (2 à 3 centimètres). On active beaucoup l'évaporation en produisant un courant d'air à la surface du liquide. Un dispositif commode consiste à placer à peu de distance au-dessus de la surface un petit entonnoir dont la douille, dirigée vers le haut, est reliée à une trompe.

Dosage du beurre dans le lait

213. — On utilisera une méthode qui s'applique aussi bien au lait frais qu'à celui qui a subi la coagulation spontanée. Dans ce but on commence par ajouter à 10 grammes de lait[1], pesés dans un récipient léger, en verre mince, assez d'une solution de soude à 1,5 % pour redissoudre la caséine. La quantité employée aug-

---

[1] Le lait conservé quelques jours ou coagulé partiellement n'est plus homogène, la matière grasse s'étant presque entièrement séparée. On ne peut la remettre en suspension par simple agitation. Pour y parvenir, après avoir redissous la caséine avec la soude à 1,5 %, on ajoute au lait un peu de saponine (de 0gr,04 à 0gr,05 par litre), et on chauffe quelques instants vers 40°. Il suffit alors d'agiter pour remettre la matière grasse en suspension homogène. (A. Frouin.)

mente nécessairement avec l'acidité. On transvase dans une ampoule à robinet, on rince le vase avec 5 à 10 centimètres cubes d'alcool à 96°, puis à deux reprises avec un même volume d'éther, les liquides de lavage étant soigneusement recueillis dans l'ampoule. On bouche celle-ci, puis on agite doucement de manière à éviter l'émulsion. Les matières grasses passent dans l'éther; dès que la séparation est complète, on laisse écouler par le robinet la couche inférieure, qui contient la caséine. La solution éthérée est lavée avec quelques centimètres cubes d'eau, que l'on décante par le robinet et que l'on réunit à la caséine, puis versée par le haut de l'ampoule dans une capsule tarée. On introduit à nouveau dans l'ampoule la solution alcaline de caséine, et on l'épuise avec 15 à 20 centimètres cubes d'éther, comme la première fois; on réunit la nouvelle solution éthérée à la première et on évapore jusqu'à poids constant, comme on l'a indiqué pour le dosage précédent.

La solution de caséine résiduelle peut être utilisée pour le dosage de la caséine du lait (voir § **357**).

Dosage des matières grasses dans les tissus animaux

214. — On ne peut extraire la totalité des matières grasses contenues dans ces tissus par un simple épuisement. Il faut au préalable dissocier la substance par l'action des alcalis (Kumagawa et Suto). Dans cette opération, les graisses et les éthers de la cholestérine sont saponifiés et on recueille un mélange d'acides

gras et de cholestérine que l'on sépare et que l'on dose.

215. — *Dissolution de la substance et extraction du produit.* Pour faire le dosage, on hache très finement l'organe étudié (foie, reins, muscles, etc.), et on pèse exactement un poids donné de pulpe, variant de 5 à 10 grammes, selon la richesse présumée. La quantité pesée est introduite dans un vase de Bohême avec 5 centimètres cubes d'eau et 15 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B. ; on chauffe au bain-marie, en ayant soin de faire plonger le vase dans l'eau bouillante et en le couvrant avec un verre de montre pour éviter l'évaporation. Au bout de deux heures, pendant lesquelles on doit agiter de temps à autre, la dissolution est totale. On laisse un peu refroidir et on verse dans une boule à décantation de 250 centimètres cubes de capacité ; le vase est ensuite lavé trois fois avec un peu d'eau chaude, qui est ajoutée à la solution. On verse alors dans celle-ci, en agitant et goutte à goutte, de l'acide chlorhydrique au 1/4 (1 volume d'acide concentré et 3 volumes d'eau) jusqu'à réaction légèrement acide (il faut environ 50 centimètres cubes). On refroidit au besoin pendant l'opération. Après refroidissement complet, on ajoute au liquide son volume d'éther et on mélange bien. Quand les deux couches sont séparées, on décante le liquide acide au moyen du robinet, en laissant les dernières portions, rendues troubles par un léger précipité, dans la boule à décantation. La couche éthérée, colorée en brun, est décantée dans un ballon, aussi bien que possible, par la partie supérieure de la boule. Il reste dans celle-ci un peu de

liquide contenant le précipité qui s'est formé, et qui renferme encore des matières grasses. On l'additionne de 5 centimètres cubes de soude normale, pour redissoudre le précipité, et on agite avec 25 à 30 centimètres cubes d'éther, puis on verse le liquide acide qui avait été recueilli à part, et on agite à nouveau. La réaction redevient acide, et les acides gras, remis en liberté, passent dans l'éther. Celui-ci est décanté avec soin et réuni à la première solution éthérée. On distille l'éther au bain-marie; le résidu, repris par un peu d'éther sec, est filtré dans un entonnoir dont la douille est garnie d'un petit tampon de coton hydrophile. On lave avec quelques gouttes d'éther et on fait sécher pendant quelques heures vers 40° à 50°. L'extrait éthéré est repris par 20 centimètres cubes d'éther de pétrole, et le liquide, filtré comme ci-dessus, est reçu dans une capsule de verre à bords verticaux. On évapore à sec et on sèche à 50° jusqu'à poids constant[1]. On a ainsi le poids des acides gras et des substances insaponifiables (comprenant surtout la cholestérine).

216. — *Séparation des substances non saponifiables.* L'extrait obtenu est redissous, après la pesée, dans 30 à 50 centimètres cubes d'éther de pétrole, et la solution, introduite dans la boule à décantation, est additionnée de 150 à 200 centimètres cubes de solution de potasse N/5 dans l'alcool absolu (12 grammes de potasse en plaques par litre d'alcool). On agite doucement et la solution homogène et limpide est peu à peu

---

[1] En chauffant à une température plus élevée, on aurait à craindre l'oxydation.

additionnée d'un volume d'eau égal à celui de potasse alcoolique précédemment introduit. On mélange et on laisse reposer. Il se sépare aussitôt deux couches; l'une, supérieure, contient les substances non saponifiables dissoutes dans l'éther de pétrole; l'autre, au-dessous, est une solution des savons des acides gras dans l'alcool à 50°. On décante cette seconde couche, on l'épuise par agitation avec 25 à 30 centimètres cubes d'éther de pétrole, et les deux solutions pétroliques réunies sont distillées. Le résidu est repris par 5 centimètres cubes d'alcool chaud; on verse 5 à 10 gouttes de la solution alcoolique de potasse N/5, on évapore au bain-marie, et on sèche à l'étuve à 100° pendant une demi-heure. On reprend de nouveau par 10 centimètres cubes d'éther de pétrole, et on filtre sur un entonnoir garni d'un petit tampon d'ouate hydrophile, comme précédemment. On lave à deux reprises avec 5 centimètres cubes d'éther de pétrole et enfin on évapore à sec dans une capsule de verre tarée. On sèche à 100° jusqu'à poids constant. On obtient ainsi le poids de la cholestérine; en le déduisant du poids précédemment trouvé, on a la quantité des acides gras provenant de la matière grasse des tissus.

La méthode ne peut être appliquée directement au sang entier ou au sérum; dans ce cas, on pèse 10 à 20 grammes de substance, on la coagule par l'alcool, et on l'extrait par l'alcool bouillant; l'extrait alcoolique peut être alors traité par la soude, etc., suivant les indications des §§ **215** et **216**.

APPENDICE

PHOSPHATIDES

Lécithines

217. — Les matières grasses sont souvent accompagnées de substances qui possèdent les mêmes propriétés générales, mais qui s'en distinguent par leur richesse en phosphore et en azote. On donne à ces substances le nom de *phosphatides*, et on les classe d'après le nombre d'atomes de phosphore et d'azote qu'elles renferment.

Parmi les phosphatides les plus répandus se trouvent les lécithines, qui sont des combinaisons d'acide glycéro-phosphorique et de choline dans lesquelles les deux oxhydriles libres de la glycérine sont éthérifiés par 2 molécules d'acide gras, stéarique, palmitique ou oléique. La lécithine distéarique, par exemple, est :

$$\begin{array}{l} CH^2.OC^{18}H^{35}O \\ | \\ CH\ .OC^{18}H^{35}O \\ | \\ CH^2.OPO \begin{cases} OCH^2\text{-}CH^2 \begin{cases} CH^3 \\ CH^3 \\ CH^3 \end{cases} = N\text{-}OH. \\ OH \end{cases} \end{array}$$

Les mélanges qui constituent la lécithine ordinaire se trouvent en abondance dans le vitellus (jaune) de

l'œuf (10 à 11 %) et dans les centres nerveux (10 à 17 %).

Préparation de la lécithine de l'œuf

218. — Pour extraire la lécithine de l'œuf, on place un jaune bien débarrassé de blanc dans un verre à pied et on le triture avec 20 centimètres cubes d'acétone que l'on décante ensuite sur un filtre ; on recommence ce traitement tant que le liquide passe coloré. La poudre blanche est exprimée entre des doubles de papier à filtrer, puis remise dans le verre et triturée avec 20 centimètres cubes de chloroforme. L'acétone déshydrate le jaune d'œuf, dissout la matière colorante et les graisses, mais non la lécithine ; celle-ci est au contraire dissoute par le chloroforme. On filtre et on recueille celui-ci dans un ballon d'environ 100 centimètres cubes ; on épuise de nouveau le résidu par 10 centimètres cubes de chloroforme. Les solutions réunies dans le ballon sont distillées au bain-marie, afin de récupérer les dissolvants ; il reste un sirop peu coloré de lécithine brute (environ 1 gramme) que l'on débarrasse des dernières traces de chloroforme en insufflant un courant d'air dans le ballon.

On peut caractériser la lécithine par ses produits d'hydrolyse, notamment l'acide phosphorique et la choline.

Le résidu de l'extraction chloroformique constitue l'ovovitelline, dont l'étude est faite au § **340**.

Hydrolyse de la lécithine et caractérisation de la choline

219. — La lécithine (provenant d'un jaune d'œuf) est placée dans une capsule de 100 à 150 centimètres

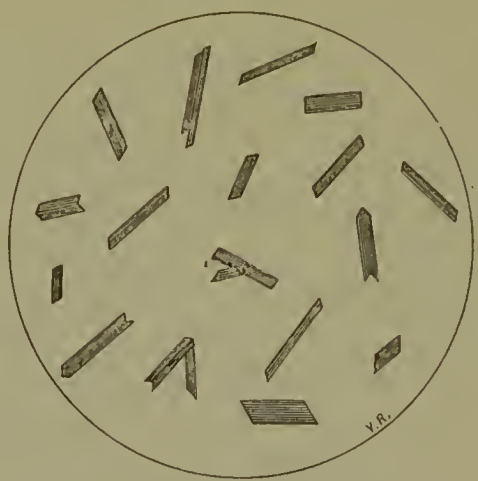


Fig. 25. — Cristaux de Florence.

cubes avec 5 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B. et 20 centimètres cubes d'eau. On fait bouillir pendant cinq minutes, puis on ajoute 4 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable, on agite et on fait bouillir encore une minute (vérifier que le liquide est acide). On laisse refroidir et on filtre sur un filtre mouillé. On met sur une lame de verre 1 goutte du liquide et 2 gouttes d'une solution concentrée d'iode dans l'iodure de potassium (iode, 5 grammes ; iodure, 10 grammes ; eau, 100 centimètres cubes), puis on examine à un faible grossissement (ocul. 2, obj. 2). Il se

fait un précipité ocreux, se changeant bientôt en cristaux opaques, bruns (cristaux de Florence) (*fig.* 25). Ces cristaux, formés d'iodhydrate d'iodure de choline, disparaissent au bout de quelques instants. Leur apparition permet de caractériser à coup sûr la choline.

Dans le liquide restant, on peut caractériser l'acide phosphorique, en le transformant soit en phosphate ammoniaco-magnésien, soit en phosphomolybdate d'ammonium (§ **13** et **14**).

CHAPITRE X

ESSENCES VÉGÉTALES ET TERPÈNES

Composés terpéniques et essences

220. — Les essences végétales sont des mélanges de plusieurs corps volatils, par conséquent entraînables par la vapeur d'eau, qui renferment généralement un terpène parmi leurs principes constituants. On peut y trouver, suivant les cas, des substances appartenant à des groupes très variés; par exemple des alcools, des phénols, des aldéhydes, etc. Ces essences sont presque toujours enfermées dans des glandes de dimensions relativement grandes, dont on aura un bon exemple en examinant une coupe mince d'écorce d'orange ou de citron.

Les essences laissent sur le papier une tache ayant l'apparence d'une tache d'huile, mais disparaissant par évaporation.

Les principaux terpènes en $C^{10}H^{16}$ sont le pinène (de l'essence de térébenthine) et le limonène ou citrène (de l'essence de citron, de bergamote, etc.). On peut également citer le phellandrène (essence de fenouil), et, parmi les sesquiterpènes, en $C^{15}H^{24}$, le caryophyllène (essence de girofle).

Extraction d'une essence par distillation avec la vapeur d'eau

221. — Dans un grand ballon de 2 à 3 litres, on place la matière végétale dont on veut extraire l'essence (écorce de citron, graine d'anis, écorce de cannelle, feuilles d'eucalyptus ou de lavande, térébenthine, etc.), préalablement divisée, avec une quantité d'eau suffisante pour remplir le ballon au moins à moitié. On réunit le ballon à un réfrigérant ascendant de Schlœsing-Aubin, et l'on distille. Les premières parties du liquide condensé sont formées par de l'eau contenant en suspension des gouttelettes d'essence. On poursuit la distillation jusqu'à ce que ces gouttelettes, de moins en moins abondantes, aient complètement cessé d'apparaître. On abandonne le produit distillé dans un récipient bouché, pendant un à deux jours, et on isole par décantation l'essence qui s'est complètement séparée. En soumettant à une nouvelle distillation dans l'appareil ci-dessus la couche d'eau qui accompagnait l'essence et qui est saturée de celle-ci, on peut encore obtenir la séparation d'une nouvelle quantité du produit volatil.

Réaction du pinène

222. — La plupart des terpènes, qui sont des corps non saturés, donnent avec le chlorure de nitrosyle un produit d'addition caractéristique. Avec le pinène de l'essence de térébenthine, on a :

$$C^{10}H^{16} + NOCl = C^{10}H^{16}.NOCl.$$

On mélange dans un gros tube à essai 3 centimètres cubes d'essence de térébenthine, 4 centimètres cubes de nitrite d'amyle et 7 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable, et on plonge dans un mélange réfrigérant de glace et de sel. Quand le mélange est bien refroidi, on y ajoute goutte à goutte, en agitant continuellement et faisant refroidir de temps en temps, 7 centimètres cubes d'un mélange à volumes égaux d'acide chlorhydrique concentré et d'acide acétique cristallisable. Du liquide bleu verdâtre se sépare peu à peu une poudre cristalline blanche de nitrosochlorure que l'on peut recueillir à la trompe et laver avec un peu d'alcool. Ce corps, dissous dans le chloroforme et reprécipité de cette solution par l'alcool méthylique, fond à 103°.

Dosage des éthers dans l'essence de lavande

223. — Un certain nombre d'essences (lavande, bergamote, etc.) renferment des éthers-sels qui peuvent y être dosés par saponification, suivant une méthode tout à fait comparable à celle qui est en usage pour les corps gras (voir indice de saponification, § **172**). A cause de la volatilité de l'essence, on opère le traitement par la potasse dans un appareil muni d'un réfrigérant ascendant.

224. — On introduit 4 centimètres cubes d'essence de lavande, dont on détermine exactement le poids, dans un petit ballon de 100 centimètres cubes, on ajoute 10 centimètres cubes de solution alcoolique de potasse à peu près normale, on adapte au col du ballon

un bouchon de liège muni d'un long tube de verre qui sert de réfrigérant, et on chauffe au bain-marie. Après une demi-heure, on laisse refroidir, on ajoute 50 centimètres cubes d'alcool, quelques gouttes de phtaléine du phénol et on sature avec l'acide sulfurique normal jusqu'à disparition de la teinte rouge. D'autre part, on titre avec l'acide normal 10 centimètres cubes de la même solution de potasse. La différence entre les volumes d'acide normal employés dans les deux opérations représente la quantité de potasse qui a servi à neutraliser l'acide engagé dans la combinaison éthérée ; elle permet donc de calculer la quantité d'éther (acétate de linalyle dans le cas présent) contenue dans l'essence.

Chaque centimètre cube d'acide sulfurique normal correspond à $0^{gr},196$ d'acétate de linalyle ; la quantité trouvée est habituellement rapportée à 100 grammes d'essence.

Il est évident que si l'essence analysée est acide, on doit préalablement déterminer la quantité de potasse qu'elle sature (en présence d'alcool et de phtaléine) et en tenir compte dans le dosage.

Principaux éthers contenus dans les essences

Éthers :	Essences de :
Anthranilate de méthyle $C^6H^4.NH^2.COOCH^3$....	Jasmin, orange, tubéreuse.
Salicylate de méthyle $C^6H^4.OH.COOCH^3$.....	Gaultheria, reine des prés.
Acétate de géranyle $CH^3\text{-}CO.OC^{10}H^{17}$.....	Palma-rosa.
Acétate de linalyle $CH^3\text{-}CO.OC^{10}H^{17}$.....	Lavande, bergamote, néroli.
Acétate de bornyle $CH^3\text{-}CO.OC^{10}H^{17}$.....	Feuilles de conifères, thym.

Éthers :	Essences de :
Acétate de terpinéyle CH^3-$CO.OC^{10}H^{17}$.....	Eucalyptus, niaouli.
Acétate de menthyle CH^3-$CO.OC^{10}H^{19}$.....	Menthe.
Acétate de santalyle CH^3-$CO.OC^{15}H^{25}$.....	Santal.
Estragol $C^6H^4.C^3H^5.OCH^3$.	Estragon.
Anéthol *id.*	Anis, fenouil, badiane.

Dosage des alcools dans l'essence de menthe

225. — Pour doser les alcools contenus dans une essence, on traite d'abord celle-ci par un excès d'anhydride acétique qui transforme les alcools en éthers acétiques. On élimine l'excès de réactif et l'on est ramené au cas précédent, mais ici la quantité d'acide sulfurique trouvée est calculée en alcool.

226. — On chauffe 10 centimètres cubes environ d'essence de menthe, placée dans un ballon de 100 centimètres cubes muni d'un réfrigérant ascendant, avec 10 centimètres cubes d'anhydride acétique et 2 grammes d'acétate de sodium fondu anhydre. Après une heure à une heure et demie d'ébullition, le menthol est transformé en éther acétique. On fait refroidir, et on traite par l'eau pour enlever l'excès de réactif. Dans ce but, on ajoute environ 50 centimètres cubes d'eau, quelques gouttes de tournesol et, tout en agitant, on verse peu à peu une solution de carbonate de sodium, jusqu'à ce que le liquide aqueux reste alcalin malgré l'agitation. On transvase alors le contenu du ballon dans une petite ampoule à robinet, on soutire le liquide aqueux, puis on fait couler l'essence dans un petit flacon contenant

quelques grammes de sulfate de sodium anhydre. Celui-ci est obtenu en desséchant à feu nu du sulfate ordinaire dans une capsule de porcelaine, jusqu'à ce que les cristaux transparents soient transformés en une poudre blanche et opaque. On agite vigoureusement pour dessécher l'essence acétylée, on filtre sur un filtre sec et on prélève un poids déterminé, soit 3 à 4 grammes, sur lequel on procède au dosage des éthers comme il est indiqué § **224**, mais en ajoutant 20 centimètres cubes de potasse alcoolique (au lieu de 10).

La quantité d'acide sulfurique normal employée correspond non seulement à la potasse utilisée pour saponifier l'acétate de menthyle formé, mais encore à celle qui a servi à saponifier les éthers existant normalement dans l'essence. Cette dernière quantité doit donc être déterminée par un dosage préalable et déduite de la quantité totale, si on veut calculer seulement celle qui se trouvait libre.

Mais ce n'est pas tout. Le poids d'essence acétylée mis en expérience doit être diminué du poids d'acétyle qu'il renferme; il suffit de remarquer que chaque centimètre cube d'acide sulfurique normal correspond aussi bien à $0^{gr},156$ de menthol qu'à $0^{gr},043$ d'acétyle. En appelant p le poids d'essence acétylée, et n le nombre de centimètres cubes d'acide normal (corrigé), le poids réel de l'essence est donné par :

$$p - (n \times 0{,}042)\ (^1).$$

---

(1) D'après la réaction : $R.OH + CH^3\text{-}COOH = R.OOC\text{-}CH^3 + H^2O$, Le groupement acétyle remplace un H de l'alcool : il faut donc retrancher du poids p la quantité $\frac{n \times (43 - 1)}{1000}$ ou $n \times 0{,}042$.

et la quantité d'alcool $^0/_0$, par la formule :

$$\frac{n \times 0{,}156 \times 100}{p - (n \times 0{,}042)}.$$

Principaux alcools contenus dans les essences

Alcools :		Essences de :
Géraniol	$C^{10}H^{18}O$...	Géranium, rose, citronelle, palmarosa.
Linalol	*id.* ...	Linaloé, lavande, néroli, bergamote.
Bornéol	*id.* ...	Camphre de Bornéo, citronelle, romarin.
Terpinéol	*id.* ...	Niaouli, eucalyptus, valériane.
Rhodinol	$C^{10}H^{20}O$...	Rose, géranium.
Citronellol	$C^{10}H^{20}O$...	Citronelle.
Menthol	*id.* ...	Menthe poivrée, menthe pouliot.
Santalols	$C^{15}H^{26}O$...	Santal.

Dosage de l'aldéhyde cinnamique dans l'essence de cannelle

227. — Ce dosage est basé sur le fait que l'aldéhyde cinnamique peut, à l'inverse des autres constituants de l'essence, donner avec le bisulfite de sodium une combinaison soluble dans l'eau :

$$C^6H^5\text{-}CH{=}CH\text{-}CHO + SO^3NaH = C^6H^5\text{-}CH{=}CH\text{-}CH \begin{cases} OH \\ SO^3Na. \end{cases}$$

En mesurant la partie de l'essence non dissoute, on obtient par différence la quantité d'aldéhyde.

228. — Dans une fiole d'environ 150 centimètres cubes dont le col, long et étroit, porte une graduation en dixièmes de centimètres cubes, on verse avec une pipette 10 centimètres cubes d'essence. On ajoute un excès de bisulfite de sodium en solution concentrée (soit 50 centimètres cubes de solution du commerce à 36° B.). On agite pour opérer la combinaison, qui se sépare à l'état solide. On verse 50 centimètres cubes d'eau environ, et on chauffe au bain-marie, en agitant souvent, pour dissoudre complètement la combinaison bisulfitique et mettre en liberté le résidu terpénique. On étend d'eau de manière à ramener ce résidu dans la partie graduée du col, on fait refroidir et on lit le volume n du liquide surnageant. La quantité d'aldéhyde $^0/_0$ est donnée par :

$$(10 - n) \times 10.$$

On opérera de même pour effectuer le dosage de l'aldéhyde benzoïque dans l'essence d'amandes amères, par exemple.

Principaux aldéhydes contenus dans les essences

Aldéhydes :	Essences de :
Citral $C^{10}H^{16}O$	Cédrat, citron, mélisse.
Citronellal $C^{10}H^{18}O$...	Citronelle, lemon-grass, citron.
Aldéhyde benzoïque $C^6H^5.CHO$	Amandes amères, niaouli.
Aldéhyde cinnamique $C^6H^5.CH{=}CH.CHO$ ...	Cannelle de Ceylan et de Chine.
Aldéhyde cuminique $C^6H^4.C^3H^7.CHO$.....	Cumin.

Aldéhydes :	Essences de :
Aldéhyde salicylique $C^6H^4.OH.CHO$.....	Reine des prés.
Aldéhyde anisique $C^6H^4.OCH^3.CHO$....	Badiane, fenouil.

Dosage des phénols dans une essence

229. — Ce dosage est basé sur la solubilité des phénols (thymol, eugénol, etc.) dans les solutions aqueuses de potasse ou de soude, qui ne dissolvent pas les carbures terpéniques. On doit noter cependant que des solutions alcalines trop concentrées peuvent dissoudre des constituants non phénoliques d'une essence; aussi doit-on employer une solution de soude à 5 °/₀ au plus pour le dosage des phénols, dans les essences telles que celle de thym. Pour les essences contenant de l'eugénol, il est prudent de ne pas dépasser une concentration en soude de 3 °/₀.

230. — *Dosage du thymol dans l'essence de thym.* Dans la fiole d'environ 150 centimètres cubes décrite plus haut et dont le col long et étroit porte une graduation en dixièmes de centimètres cubes, on verse 10 centimètres cubes de lessive des savonniers, 80 centimètres cubes d'eau, et 5 centimètres cubes d'essence. On agite et on laisse reposer. Lorsque l'essence non dissoute s'est complètement séparée, on verse peu à peu de la soude à 5 °/₀ de façon à ramener la limite de séparation des deux liquides dans le col gradué. La diminution de volume de l'essence représente approximativement la quantité de thymol qu'elle renferme.

Celui-ci peut être séparé en décantant la solution alcaline, à laquelle on ajoute un léger excès d'acide sulfurique. On laisse reposer jusqu'au lendemain ; le thymol se rassemble peu à peu à la surface.

231. — *Dosage de l'eugénol dans l'essence de girofle.* On opère exactement comme pour l'essence de thym, en versant dans le ballon 6 centimètres cubes de lessive des savonniers, 80 centimètres cubes d'eau et 5 centimètres cubes d'essence. On complète ensuite le volume avec une lessive de soude à 3 $^0/_0$.

Principaux phénols contenus dans les essences

Phénols :		Essences de :
Thymol	$C^6H^3.CH^3.C^3H^7.OH$..	Thym, serpolet, ajowan.
Carvacrol	*id.*	Origan, sarriette, thuya.
Eugénol	$C^6H^3.C^3H^5.OCH^3.OH$.	Girofle, cannelle de Ceylan.

APPENDICE

CHOLESTÉRINE ET ACIDES BILIAIRES

Réactions de la cholestérine

232. — La cholestérine $C^{27}H^{46}O$ est un dérivé terpénique ayant une fonction alcoolique tertiaire, qui

accompagne généralement les substances grasses chez les êtres vivants. Elle est présente dans la bile et forme souvent des calculs dans la vésicule biliaire. Elle se dissout dans les dissolvants des graisses et peut en être séparée par l'action des alcalis; ceux-ci saponifient les graisses et les transforment en savons solubles dans l'eau; la cholestérine inattaquée reste comme résidu insoluble. On peut la caractériser par les réactions suivantes :

233. — On dissout un fragment de substance, gros comme deux têtes d'épingle, dans 2 à 3 centimètres cubes de chloroforme, en chauffant légèrement au besoin, puis on agite avec un volume égal d'acide sulfurique pur et concentré. Le chloroforme se colore en rouge sang, l'acide devient verdâtre fluorescent. En ajoutant 5 à 6 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable, ce dernier se colore en rose, avec une fluorescence verte très marquée (Salkowski).

234. — Si on dissout quelques cristaux de cholestérine dans 1 centimètre cube de chloroforme et que l'on ajoute 1 centimètre cube d'anhydride acétique, on a, par addition d'acide sulfurique concentré, goutte à goutte, une série de colorations, rose, violette, bleue et verte. La première teinte rose se produit avec une seule goutte d'acide sulfurique; elle passe rapidement au violet. Le bleu se forme un peu plus tard, et le vert n'apparaît qu'après une addition ultérieure d'acide.

235. — Dissoudre un fragment de substance dans 1 à 2 centimètres cubes d'alcool, en chauffant. Mettre

sur une lame de verre porte-objet 2 à 3 gouttes de cette solution, qui donne par évaporation des cristaux en tables rhombiques (*fig.* 26). Examiner ceux-ci au microscope. Les mouiller avec une goutte d'acide sulfurique un peu aqueux (5 parties d'acide sulfurique con-

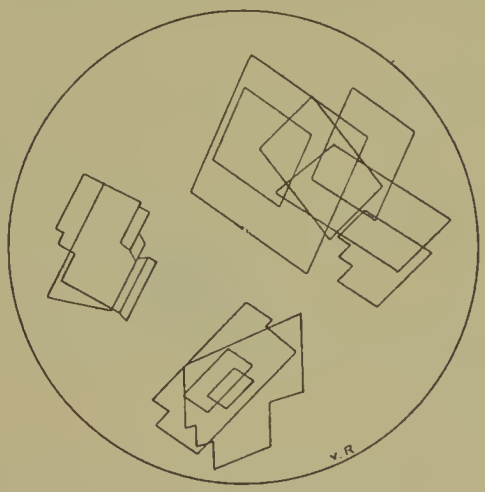


Fig. 26. — Cholestérine.

centré et 1 partie d'eau), puis chauffer très légèrement : les arêtes des cristaux se colorent en rouge, puis en violet.

236. — On évapore 2 centimètres cubes de solution chloroformique de cholestérine dans une petite capsule, on mouille le résidu avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique contenant un peu de chlorure ferrique (l'acide jaune du commerce convient) et on évapore à sec. Il se produit une coloration violette.

Réactions des acides biliaires

237. — Les acides biliaires, acide glycocholique et acide taurocholique, sont des combinaisons de l'acide cholalique, qui est un dérivé terpénique complexe, avec le glycocolle et la taurine. Ils existent dans la bile à l'état de sels alcalins, de saveur extrêmement amère. Pour les rechercher, on peut utiliser la réaction de Pettenkofer, qui consiste dans la production d'une coloration rouge pourpre en présence de saccharose et d'acide sulfurique. Cette coloration pouvant être donnée par des corps autres que l'acide cholalique et ses dérivés, on augmentera la précision de la recherche en examinant le spectre d'absorption de la solution colorée obtenue.

238. — On verse dans un tube à essai 3 centimètres cubes d'eau, puis on y laisse couler avec précaution 6 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré. On agite doucement, sous un courant d'eau, pour refroidir le mélange. Quand celui-ci est bien homogène, on ajoute 6 gouttes d'une solution de lévulose à 10 °/₀ puis une goutte de bile fraîche, et on agite. Si la température est voisine de 25-30°, on voit apparaître, après environ cinq minutes, une coloration rose pâle, qui s'accentue progressivement. Après dix minutes environ, le liquide rose violacé, qui présente la teinte d'une solution très diluée de permanganate, est examiné au spectroscope à main. On voit d'abord apparaître une bande sombre assez large dans le vert (à peu près entre les longueurs d'onde 500 et 530) et une deuxième

faible et étroite dans le jaune (vers la longueur d'onde 575) (*fig.* 27). Peu à peu ces bandes s'élargissent et envahissent tout le spectre, à l'exception du rouge, au fur et à mesure que le liquide se colore.

239. — Pour apercevoir commodément ces deux bandes, on règle le spectroscope à main de façon que

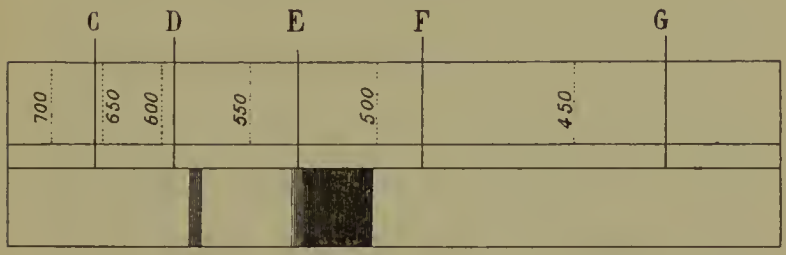


Fig. 27. — Réaction de Pettenkofer : spectre d'absorption.

la fente ne soit pas trop large, le spectre étant néanmoins assez éclairé ; on met au point de manière à apercevoir nettement les fines raies noires du spectre solaire, et on déplace l'échelle graduée en longueurs d'onde, jusqu'à ce que la division 590 coincide avec la raie D. La raie E est alors à la division 530 environ.

On peut remplacer le lévulose par du saccharose ; la réaction se produit alors un peu plus lentement. Elle serait due, d'après Ville et Derrien, à la présence de méthyloxyfurfurol, formé dans l'action de l'acide sulfurique sur le lévulose.

240. — Les acides biliaires et leurs sels diminuent d'une façon extrêmement marquée la tension superficielle de l'eau. Cette propriété peut être mise en évidence de la manière suivante. Dans un verre à pied à

demi plein d'eau distillée, on fait tomber une très petite goutte de bile et on mélange. Si on saupoudre la surface du liquide avec un peu de fleur de soufre ou de charbon en poudre, ces corps tombent presque aussitôt au fond du verre ; ils flottent au contraire très longtemps, sans être mouillés, sur de l'eau pure. On peut déceler ainsi moins de 1/10.000 d'acides biliaires.

Dosage de la cholestérine dans les tissus

241. — La cholestérine qui existe dans les tissus, surtout à l'état d'éthers, peut être mise en liberté par l'action de la soude et extraite ensuite avec un dissolvant approprié.

On peut la doser, concurremment avec les acides gras, par la méthode décrite § **214**. Si on veut seulement doser la cholestérine, on simplifiera de la manière suivante.

242. — On chauffe 5 à 10 grammes de l'organe étudié, finement divisé, avec 15 centimètres cubes d'eau et 15 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B., au bain-marie. Il faut avoir soin de faire plonger le vase dans l'eau bouillante et de le couvrir avec un verre de montre pour éviter l'évaporation. Après deux heures de chauffage, on ajoute 20 centimètres cubes d'eau, on mélange, on refroidit, et on épuise par 60 centimètres cubes d'éther, dans une boule à décanter. On recueille l'éther dans un ballon ; on épuise encore une fois le liquide alcalin avec 30 à 40 centimètres cubes d'éther, que l'on décante et que l'on réunit au premier extrait

éthéré. L'éther est distillé au bain-marie, et le résidu, séché complètement, est repris par 10 centimètres cubes d'alcool, auquel on ajoute une seule goutte de lessive de soude. On évapore au bain-marie, et on sèche à l'étuve à 100° pendant une demi-heure. On épuise le résidu sec par 10 à 15 centimètres cubes d'éther de pétrole, et on filtre sur un petit entonnoir dont la douille est garnie d'un tampon de coton hydrophile. Le liquide est reçu dans une capsule de verre tarée, à bords verticaux ; on lave le filtre deux fois avec quelques centimètres cubes d'éther de pétrole, on évapore et on sèche à 100° jusqu'à poids constant. On pèse le résidu cristallisé qui est formé par la cholestérine.

CHAPITRE XI

ALCALOÏDES

Réact ons de précipitation des alcaloïdes

243. — Presque tous les alcaloïdes végétaux donnent en solution aqueuse des précipités très peu solubles avec les réactifs suivants :

Iodure de potassium iodé.....	précipité brun
— de mercure et de potassium.....	— blanc
Acide silicotungstique.....	— blanc ou légèrement coloré.

à la condition toutefois d'opérer en milieu légèrement acide (un ou deux millièmes d'acide chlorhydrique ou sulfurique). La plupart sont également précipités, mais à une concentration plus élevée, par :

L'acide picrique.....	précipité jaune	souvent cristallisé
Le chlorure mercurique.	précipité blanc	—
Le chlorure de platine ..	précipité jaune	—

Le tannin, le ferrocyanure de potassium acétique, etc.

Enfin, ceux qui sont insolubles dans l'eau sont précipités des solutions de leurs sels par l'ammoniaque ; le précipité est généralement blanc et amorphe, insoluble dans un excès de réactif.

Toutefois la morphine se dépose à l'état cristallin et, d'autre part, se redissout facilement dans un excès d'ammoniaque.

On essaiera les réactions de précipitation des alcaloïdes avec des solutions à 1 ou 2 % de sulfates de quinine et de strychnine et de chlorhydrate de morphine.

Réactions colorées des alcaloïdes

244. — Certains alcaloïdes donnent des réactions colorées caractéristiques. On choisira comme exemples la quinine, la cinchonine, la strychnine, la brucine, la morphine, la codéine, l'atropine et la cocaïne.

Quinine. On notera la fluorescence bleue spéciale des sels de quinine en solution sulfurique, qui constitue déjà un très bon caractère.

Les sels de quinine donnent une réaction colorée très sensible, connue sous le nom de réaction de la thalléioquine. Pour la réussir, il convient d'opérer de la manière suivante :

A 5 centimètres cubes d'une solution saturée à froid de sulfate de quinine, placés dans un tube à essai, on ajoute 6 gouttes d'eau de brome saturée ; cette quantité est suffisante pour donner au liquide une légère coloration jaune, mais sans produire un précipité persistant. Si on ajoute alors une seule goutte d'ammoniaque étendue de 2 à 3 volumes d'eau, on a, par agitation, une

belle coloration rouge groseille assez fugace. Par addition de quelques gouttes d'ammoniaque en excès, on voit la coloration rouge passer instantanément au vert émeraude. Cette dernière coloration est stable.

Une quantité trop petite ou trop grande d'eau de brome empêche la réaction de se produire.

Les liquides colorés, soit en rouge, soit en vert, étant agités avec 2 centimètres cubes d'alcool amylique, abandonnent les matières colorantes à ce dissolvant.

245. — *Cinchonine.* Les solutions aqueuses de cinchonine ou de ses sels, étant *légèrement* acidulées par l'acide sulfurique à 10 %, donnent, avec quelques gouttes de ferrocyanure de potassium à 10 % un précipité jaune. Si on chauffe légèrement le liquide, vers 50 à 60°, le précipité se redissout et par refroidissement il se dépose de très jolies aiguilles jaune d'or, très brillantes.

246. — *Strychnine.* Si on dissout une trace de strychnine dans une grosse goutte d'acide sulfurique concentré, placée au centre d'une soucoupe ou d'une capsule de porcelaine, et si on laisse tomber sur le liquide une très petite pincée de bichromate de potassium finement pulvérisé, on voit chaque grain de ce sel se dissoudre en donnant une tache violette ; en remuant avec un agitateur, tout le liquide se colore en beau violet pourpre, passant bientôt au rouge brunâtre.

247. — *Brucine.* On dissout une trace de brucine, placée dans un verre de montre, au moyen d'une goutte d'acide nitrique concentré ; il se fait une coloration

rouge sang. Par addition d'une goutte de solution de chlorure stanneux, la teinte vire au violet.

La morphine et la codéine donnent aussi une tache rouge avec l'acide nitrique, mais le chlorure d'étain ne modifie pas la couleur rouge.

248. — *Morphine.* La morphine, possédant une fonction phénolique, donne avec le chlorure ferrique une coloration bleue, si la solution n'est pas trop étendue.

249. — Elle présente un pouvoir réducteur très marqué. Si à 2 centimètres cubes de solution aqueuse d'acide iodique à 10 $^0/_0$ on ajoute quelques gouttes de solution d'un sel de morphine, le liquide se colore en jaune. Par agitation avec 1 centimètre cube de chloroforme, ce dernier prend une teinte violette due à l'iode mis en liberté.

250. — Si à 10 centimètres cubes de solution étendue de chlorhydrate de morphine on ajoute 1 centimètre cube d'ammoniaque, 1 centimètre cube d'eau oxygénée à 5-10 volumes, et 1 goutte de solution de sulfate de cuivre à 1-4 $^0/_0$, il se produit une coloration rose rougeâtre (Denigès).

251. — *Codéine.* Cet alcaloïde est l'éther méthylique de la morphine. Il ne possède plus la fonction phénol, aussi ses solutions ne donnent pas la coloration bleue avec le chlorure ferrique et ne réduisent pas l'acide iodique.

252. — En revanche, si on ajoute à quelques gouttes de solution de codéine 1 à 2 centimètres cubes d'acide

sulfurique concentré et une seule goutte de solution étendue de chlorure ferrique, il se fait une coloration bleu foncé. Cette réaction est facilitée par un léger chauffage; elle est également donnée par la morphine.

253. — *Atropine.* Quelques cristaux d'atropine, placés dans une petite capsule et mouillés d'une goutte d'acide nitrique concentré, s'y dissolvent sans coloration. Si on évapore à sec sur le bain-marie et si, après refroidissement, on ajoute au résidu 2 à 3 gouttes d'une solution récemment préparée de potasse alcoolique (obtenue en faisant bouillir une pastille de potasse avec 2 centimètres cubes d'alcool à 90°, dans un tube à essai), on voit se produire une coloration violette (réaction de Vitali).

254. — *Cocaïne.* La cocaïne, traitée exactement comme il est indiqué au paragraphe précédent pour l'atropine (c'est-à-dire évaporée à sec avec l'acide nitrique et reprise par la potasse alcoolique), ne donne pas de coloration, mais il se dégage une odeur rappelant celle de la menthe.

255. — En solution pas trop étendue, les sels de cocaïne sont précipités par le permanganate de potassium, qu'ils ne réduisent pas. Pour faire la réaction, on ajoute à 1 centimètre cube de solution de chlorhydrate de cocaïne à 2-3 $^0/_0$ quelques gouttes de solution de permanganate à 2 $^0/_0$; il se produit un précipité violet clair.

256. — *Caféine.* Voir aux composés puriques, § **354**.

Dosage simplifié de la quinine dans l'écorce de quinquina

257. — Cette méthode consiste à mettre l'alcaloïde en liberté par l'ammoniaque aqueuse, puis à extraire du mélange non desséché par le chloroforme.

Dans un flacon de 125 centimètres cubes, on introduit 10 grammes d'écorce de quinquina préalablement pulvérisée et tamisée sans résidu. La poudre doit être aussi fine que possible et passée au tamis de soie n° 80. On ajoute 15 centimètres cubes d'ammoniaque concentrée ($d = 0,92$) et 15 à 20 grammes de gros plomb de chasse. On bouche avec un bouchon de liège et on secoue vivement de manière à obtenir une pâte bien homogène. Après une demi-heure de contact, on ajoute 25 centimètres cubes de chloroforme, on bouche et on agite à nouveau. L'alcaloïde passe dans le dissolvant. On remplace alors le bouchon par un autre percé d'un trou que traverse un petit tube effilé (de 5 à 6 millimètres de diamètre) dont l'intérieur est garni d'un tampon peu serré d'ouate hydrophile. On retourne le flacon au-dessus d'un ballon de 250 centimètres cubes ; une partie du chloroforme s'écoule limpide à travers le tube effilé. On relève le flacon pour faire rentrer un peu d'air ; en inclinant de nouveau, une nouvelle quantité de liquide s'écoule ; en répétant cette manœuvre, on obtient facilement la totalité du chloroforme. On introduit dans le flacon une nouvelle quantité de ce dissolvant et on répète 4 à 5 fois l'extraction.

Recherche des princi

Corps en général très peu solubles dans l'eau, solubles dans
sont extrêmement amères. Les sels en solution précipitent

On dissout quelques cristaux dans 3 ou 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La solution

- possède une fluorescence bleue augmentant
  thalléioquine.....
- n'a aucune fluorescence. On y fait tomber un peu de bichromate de potassium pulvérisé
  - il se développe autour de chaque
    au rouge brun.....
  - aucune coloration. On dissout quelques cristaux de substance dans 1 goutte d'acide nitrique concentré
    - coloration
      on ajoute 1
      de solution
      chlorure stan
    - pas de colora
      On évapore à
      on ajoute 2 à
      tes de so-
      récente de po
      dans l'alcool

paux alcaloïdes solides

le chloroforme, l'éther, le benzène. Les solutions aqueuses par l'ammoniaque et les réactifs alcaloïdiques.

par addition d'eau. Elle donne la réaction de la ..... *quinine.*

grain une belle coloration violette, passant ensuite ..... *strychnine.*

rouge goutte de neux — la teinte passe au violet ..... *brucine.*

reste rouge. La substance — réduit l'acide iodique..... *morphine.*

ne réduit pas, mais sa solution sulfurique donne avec une trace de chlorure ferrique une coloration bleue..... *codéine.*

tion. sec et 3 goutlution tasse absolu — il se fait une coloration violette ..... *atropine.*

pas de coloration — odeur de menthe. La substance, en solution pas trop diluée, précipite par le permanganate de potassium à 2 %..... *cocaïne.*

il n'apparaît ni couleur, ni odeur. On acidule par l'acide sulfurique, on ajoute du ferrocyanure de potassium. Précipité jaune, soluble à chaud, cristallisant en aiguilles jaune d'or.. *cinchonine.*

Le ballon contenant la totalité du chloroforme est réuni à un réfrigérant descendant, puis on distille le liquide aussi complètement que possible au bain-marie ; pour chasser les dernières traces de chloroforme, on insuffle un peu d'air dans le ballon maintenu chaud.

Il reste à séparer les alcaloïdes des résines qui les souillent. Pour cela, on verse dans le ballon 10 centimètres cubes d'acide sulfurique à 10 $^0/_0$ et 20 centimètres cubes d'eau, puis on chauffe au bain-marie en agitant. Les alcaloïdes se dissolvent, ainsi qu'une trace de résine sans doute à fonction basique. Pour éliminer cette dernière, on neutralise presque exactement la solution maintenue chaude par de l'ammoniaque diluée, ajoutée goutte à goutte ; lorsque le liquide n'est plus que faiblement acide, on filtre, on lave avec de l'eau bouillante, enfin on neutralise le liquide recueilli dans une capsule avec de l'ammoniaque diluée, *aussi exactement* que possible. Comme indicateur, on se sert d'une bande de papier de tournesol que l'on a soin de laver avec un peu d'eau chaude, après la réaction, pour ne pas perdre d'alcaloïde. On évapore la solution neutre au bain-marie jusqu'à ce qu'il se forme à la surface une légère pellicule cristalline ; on laisse refroidir complètement, puis on recueille le sulfate de quinine à la trompe sur une petite plaque de porcelaine perforée d'environ 2 centimètres de diamètre, recouverte d'une rondelle de papier à filtrer. On se sert d'un peu du liquide filtré pour entraîner sur l'entonnoir les cristaux qui restent dans la capsule, puis on lave le précipité avec 2 centimètres cubes d'eau distillée, versée goutte à goutte avec une pipette. On retourne l'entonnoir dans une capsule de verre tarée, on y fait tomber

le précipité, qui affecte la forme d'un petit gâteau, on détache la rondelle de papier qui y adhère, enfin on fait sécher le tout à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant et on pèse.

Le sulfate de quinine ainsi obtenu n'est souillé que d'une très petite quantité de sulfate de cinchonidine ; il est anhydre et, d'après sa formule,

$$(C^{20}H^{24}N^2O^2)^2SO^4H^2,$$

renferme 86,86 % de quinine.

Dosage de la nicotine dans le tabac

258. — Le principe consiste à extraire l'alcaloïde par ébullition du tabac avec de l'eau acidulée, à précipiter l'alcaloïde brut à l'état de silicotungstate, à distiller ce sel avec de la magnésie et à titrer alcalimétriquement la nicotine (G. Bertrand et M. Javillier).

On prend 12 grammes de tabac ; on les introduit dans un ballon avec vingt-cinq fois leur poids d'acide chlorhydrique à $0^{gr},5$ % (soit 300 centimètres cubes d'eau et 4 centimètres cubes d'acide à 22° B.). On porte à l'ébullition, que l'on maintient modérée pendant une demi-heure, en ayant soin de condenser les vapeurs à l'aide d'un réfrigérant ascendant. En opérant dans un ballon d'un demi-litre, on peut se contenter d'un grand tube comme réfrigérant.

On refroidit sous un courant d'eau, on filtre à travers un tampon de coton et l'on prélève 250 centimètres cubes de liquide que l'on précipite par l'acide silicotungstique ou le silicotungstate de potassium en

solution à 20 $^0/_0$. Le précipité, très dense, est rassemblé par filtration ou mieux par centrifugation, délayé dans l'eau légèrement acidulée par l'acide chlorhydrique et contenant quelques gouttes de réactif, puis filtré ou centrifugé à nouveau.

Le silicotungstate de nicotine ainsi lavé est introduit dans un ballon à long col tubulé semblable à celui qui sert au dosage de l'acide acétique (§ **183**), mais d'une capacité de 250 centimètres cubes. On ajoute 2 à 3 grammes de magnésie calcinée délayée dans peu d'eau, et l'on distille, en faisant passer dans le mélange un courant de vapeur. Il faut veiller à ce que le mélange en réaction ne se dilue pas par condensation d'eau ; au contraire, il faut le concentrer progressivement en chauffant directement le ballon, tout en maintenant le courant de vapeur, et l'amener, à la fin, à ne plus occuper que quelques centimètres cubes.

Une centaine de centimètres cubes d'eau suffit largement à entraîner 100 à 200 milligrammes d'alcaloïde. Celui-ci est alors dosé volumétriquement. On emploie de l'acide sulfurique titré dont 1 centimètre cube correspond à 10 milligrammes de nicotine ($3^{gr},024$ par litre) [1]. Comme indicateur, on se sert d'alizarine sulfoconjuguée qui vire du rouge pourpre au jaune dès que l'alcaloïde est neutralisé. Les résultats obtenus correspondent à 10 grammes de tabac.

---

[1] On peut aussi employer de l'acide décinormal. La nicotine, de formule $C^{10}H^{14}N^2$, a pour poids moléculaire 162 ; chaque centimètre cube d'acide N/10 correspond donc à $0^{gr},0162$ de nicotine.

CHAPITRE XII

SUBSTANCES PROTÉIQUES. PROTÉINES

Substances protéiques

259. — Les matières protéiques sont des substances de composition élémentaire et de constitution très complexes : elles renferment du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, souvent du soufre, et même d'autres éléments; leur caractère essentiel consiste dans la présence dans leur molécule d'une série d'acides aminés, liés ensemble avec élimination d'eau.

Il y en a un très grand nombre d'espèces et leurs propriétés sont très différentes. On peut les diviser en trois groupes principaux : les protéines, les protéides et les protéoïdes.

Les protéines sont les matières protéiques les plus typiques, comprenant surtout les albumines et les globulines. Traitées par les agents d'hydrolyse, elles se dédoublent en protéoses, en peptones et enfin en acides aminés divers. Ceux-ci sont obtenus en proportion variable avec les diverses protéines, mais ils renferment toujours le groupement caractéristique α-aminé.

$$- CH.NH^2 - COOH.$$

Les protéides peuvent être considérés comme résultant de l'union d'une protéine et d'un groupement prosthétique de nature variée (phosphoprotéides, métalloprotéides, etc.).

Les protéoïdes constituent un groupe provisoire renfermant les matières protéiques qui ne peuvent être rangées nettement dans l'un des deux premiers groupes (osséine, kératine, etc.).

Réactions de précipitation des substances protéiques

260. — *Précipitation par les réactifs des alcaloïdes.* Les matières protéiques en solution aqueuse sont précipitées par les réactifs généraux des alcaloïdes, tels que le chlorure mercurique, le ferrocyanure de potassium, l'iodure de mercure et de potassium, l'iodure de potassium iodé, l'acide picrique, les acides phospho et silicotungstique, etc. Avec la plupart de ces réactifs, et en particulier le ferrocyanure de potassium, il est indispensable d'acidifier; on prendra de préférence l'acide acétique.

261. — *Précipitation par les sels métalliques.* Outre le chlorure mercurique déjà signalé, le sulfate de cuivre et l'acétate de plomb précipitent également la plupart des matières protéiques en donnant des combinaisons métalliques insolubles.

262. — *Précipitation par les sels neutres.* Les matières protéiques solubles autres que les peptones sont précipitées, mais sans donner de combinaisons parti-

culières, par certains sels neutres très solubles, employés à haute concentration, plus particulièrement lorsque le liquide est acidifié par l'acide acétique. On se sert habituellement de chlorure de sodium, de sulfates d'ammonium, de sodium ou de magnésium, quelquefois aussi de sulfate de zinc ; ces précipités se redissolvent si on dilue par addition d'eau. La précipitation par les sels neutres est d'ordre purement physique ; elle tiendrait exclusivement à ce que le sel très soluble s'emparerait de l'eau de la solution et en déplacerait la matière protéique.

263. — *Précipitation par les dissolvants neutres.* Certains liquides organiques, en particulier l'alcool et l'acétone, précipitent les substances protéiques, à l'exclusion de quelques peptones, de leur solution aqueuse. Dans certains cas, la matière protéique est non seulement précipitée, mais encore coagulée et ne se redissout plus dans l'eau. Le phénomène de coagulation peut ne pas être instantané et ne devenir total qu'après un contact suffisamment prolongé.

L'éther et le chloroforme ont également un pouvoir coagulant, mais moins facile à mettre en évidence, à cause de leur plus faible solubilité.

264. — *Coagulation par les acides minéraux à froid.* Les matières protéiques sont coagulées à froid par la plupart des acides minéraux (l'acide orthophosphorique fait exception). On emploie généralement l'acide nitrique concentré. On verse une petite quantité de cet acide dans un tube à essai et on fait arriver à la surface, avec précaution, à l'aide d'une pipette, la solution dans

laquelle on recherche les matières protéiques. On voit se former, à une petite distance au-dessus de la couche de séparation, une zone opaque due à la précipitation de la matière protéique.

L'acide trichloracétique en excès (2 à 5 %) agit comme les acides minéraux.

265. — *Coagulation par la chaleur.* Les solutions des albumines et des globulines coagulent par chauffage, à des températures différentes pour chacune d'elles. Il n'en est pas de même des solutions de certains protéides (nucléine, caséine, hémoglobine) ou de protéoïdes (gélatine, sérieine), non plus que des produits de dédoublement des protéines (albumoses et peptones).

Si on chauffe à l'ébullition 5 à 10 centimètres cubes de solution préalablement acidifiée par une à deux gouttes d'acide acétique, la protéine coagule en flocons, à condition que le liquide renferme une quantité suffisante de sels. S'il est trop pauvre en sels, on peut lui ajouter environ 1 % de chlorure de sodium.

Réactions colorées des substances protéiques

266. — *Réaction xanthoprotéique.* A 5 centimètres cubes de solution protéique (1 partie de blanc d'œuf et 9 parties d'eau) on ajoute $0^{cm3},5$ à 1 centimètre cube d'acide nitrique à 36° B. Il se forme en général un précipité qui se redissout en partie par chauffage. On fait bouillir pendant une à deux minutes environ : le liquide et le précipité se colorent en jaune ; l'addition d'ammoniaque fait virer la teinte à l'orangé.

Cette réaction est due à la présence de noyaux aromatiques, dont les dérivés nitrés sont colorés en jaune.

267. — *Réaction de Millon.* A 5 centimètres cubes de la solution protéique ci-dessus, on ajoute 1 à 2 centimètres cubes de réactif de Millon [1] et on fait bouillir doucement. Il se fait un précipité qui se colore en rouge, du rouge carmin au rouge brique ; si on continue à chauffer, il peut se décolorer et se redissoudre partiellement. On doit donc chauffer avec beaucoup de précaution au début.

Cette réaction, due à la présence de noyaux phénoliques substitués en para ou en diortho, est attribuable à la tyrosine dans le cas des matières protéiques. Le phénol ordinaire la donne, même à froid, avec intensité. La gélatine ne la donne pas dans les conditions ordinaires.

268. — *Réaction du biuret.* A quelques centimètres cubes de la solution protéique ajouter 1 centimètre cube de soude à 10 $^0/_0$ pour alcaliniser fortement, puis une solution de sulfate cuivrique à 1 $^0/_0$, goutte par goutte, avec une pipette : la première goutte donne une teinte rose violacé, qui vire au violet bleu par addition ultérieure de sulfate de cuivre. Cette coloration est due, au moins avec le biuret, à la formation d'un composé cupro-potassique ; elle est donnée par toutes

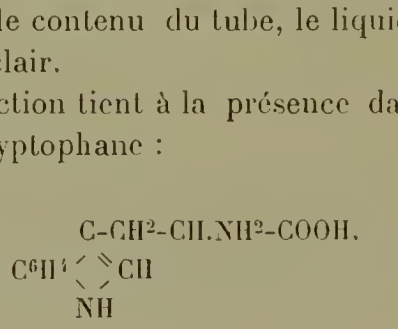
---

[1] On prépare le réactif de Millon en faisant dissoudre 1 partie de mercure dans 2 parties d'acide nitrique à 36° B., et chauffant légèrement à la fin, s'il est nécessaire. Après dissolution complète, on étend le liquide vert de 2 volumes d'eau, on agite et on décante.

les substances protéiques, mais elle est surtout intense avec les albumoses et encore plus avec les peptones; il semble que la présence d'au moins deux chaînons —CO—NH— soit nécessaire pour qu'elle se produise.

269. — *Réaction glyoxylique* (Adamkiewicz, Hopkins et Cole). A 5 centimètres cubes de solution protéique, ajouter 1 à 2 centimètres cubes de solution d'acide glyoxylique [1], mélanger, puis faire couler au fond du tube à essai, avec une pipette, 3 à 4 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré. Il se forme un anneau d'un beau violet à la surface de séparation. Si on mélange alors le contenu du tube, le liquide se colore en violet plus clair.

Cette réaction tient à la présence dans la molécule du noyau tryptophane :



Elle ne se produit pas en présence de chlorures en grande quantité, de nitrates, nitrites ou chlorates.

Elle est donnée avec une grande intensité par la caséine.

---

[1] On obtient facilement une solution d'acide glyoxylique en ajoutant à 10 centimètres cubes d'une solution saturée d'acide oxalique un fragment d'amalgame de sodium à 2 % de la grosseur d'un pois. Quand le dégagement d'hydrogène a cessé, on décante la solution claire.

270. — *Réaction furfurique* (Liebermann). Coaguler par la chaleur 5 centimètres cubes de la solution de blanc d'œuf, rejeter le liquide surnageant aussi complètement que possible et verser sur le coagulum 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré. Faire bouillir doucement pendant trois à cinq minutes, jusqu'à redissolution du coagulum ; il se produit une coloration violette qui vire peu à peu au brun [1]. On peut employer aussi, pour faire cette réaction, une petite quantité de la substance protéique en poudre fine.

Le chauffage avec l'acide chlorhydrique produit du furfurol aux dépens des groupements hydrocarbonés de la molécule et celui-ci, en présence des noyaux phénoliques, donne la coloration violette. L'albumine d'œuf fournit une réaction intense.

271. — *Réaction du soufre.* A 3 centimètres cubes de solution albumineuse, ajouter un volume égal d'une solution concentrée de soude (lessive des savonniers) et 10 gouttes d'une solution d'acétate neutre de plomb à 10 $^0/_0$. Faire bouillir. Il se développe assez rapidement (deux à trois minutes au plus) une coloration noire due au sulfure de plomb formé.

L'existence du soufre sous forme de cystine dans la molécule protéique donne lieu à la formation de sulfure de sodium en présence de l'alcali en excès ; il se fait donc du sulfure de plomb noir.

---

[1] Le liquide, examiné au spectroscope, présente alors une bande d'absorption dans le vert bleu.

Protéines animales

Séparation des albumines et des globulines

272. Le sérum sanguin, le blanc d'œuf, le suc musculaire, contiennent en dissolution des albumines et des globulines, coagulables par la chaleur et présentant toutes les réactions décrites antérieurement.

Les globulines se distinguent des albumines en ce qu'elles sont précipitées de leurs solutions lorsque l'on sature celles-ci avec du sulfate de magnésium cristallisé ; il en est de même si on ajoute au liquide son volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à la même température (ce qui équivaut à la demi-saturation avec ce sel).

Si on filtre, les albumines restent en solution dans le liquide filtré; on peut les précipiter en saturant celui-ci avec du sulfate d'ammonium pulvérisé.

273. — *Préparation des protéines du sérum.* Le sérum du sang de cheval ou de bœuf renferme de 7 à 8 $^0/_0$ de protéines, dont 4,5 $^0/_0$ de globuline et 3 $^0/_0$ d'albumine environ. On prend 100 centimètres cubes de sérum de cheval, et on y ajoute, en remuant constamment, un volume égal de solution de sulfate d'ammonium saturée à une température de 50 à 60°, filtrée et abandonnée ensuite au refroidissement. Il se fait un abondant précipité blanc de sérum-globuline que l'on recueille sur un filtre. On égoutte, on lave avec un mélange à parties égales d'eau et de solution saturée de sulfate d'ammonium, puis on essore entre des doubles de papier à filtrer. La globuline, redissoute

dans le moins possible d'eau tiède, peut être isolée par dialyse, ou insolubilisée par chauffage à l'ébullition. Dans ce dernier cas, on recueille sur un filtre, on lave à l'eau bouillante et on fait sécher.

Le liquide dont on a précipité la globuline, étant additionné de sulfate d'ammonium pulvérisé jusqu'à saturation, donne un nouveau précipité blanc, formé de sérum-albumine, que l'on peut recueillir et laver comme la globuline.

274. — *Séparation des protéines du blanc d'œuf.* Le blanc d'œuf de poule contient 10 à 13 $^0/_0$ de protéines. Pour en isoler la globuline, on divise un blanc d'œuf avec des ciseaux, aussi bien que possible, et on l'étend avec un volume à peu près égal d'eau, ce qui produit un léger trouble. On fait disparaître celui-ci par addition de quelques gouttes de solution de chlorure de sodium, puis on neutralise avec de l'acide acétique à 10 $^0/_0$, goutte à goutte, et enfin on passe à travers une toile. Le liquide est recueilli dans une éprouvette graduée ; on lui ajoute son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium et on obtient par agitation un précipité blanc d'ovoglobuline que l'on recueille sur un filtre.

Le liquide filtré renferme l'ovalbumine et l'ovomucoïde. Par addition d'acide acétique à 10 $^0/_0$ il se produit un précipité blanc d'ovalbumine qui est recueilli sur un filtre. On l'égoutte, on l'essore et on le redissout dans le moins possible d'eau tiède. La solution, saturée par agitation avec du sulfate d'ammonium pulvérisé en léger excès, laisse de nouveau précipiter l'ovalbumine. On la recueille sur un filtre, et on la lave avec la solution saturée de sulfate d'ammonium,

Cristallisation de l'albumine

275. — *Cristallisation de la sérum-albumine.* L'albumine du sérum peut, dans certaines conditions, donner des cristaux qui paraissent être une combinaison d'albumine avec des quantités variables d'acide sulfurique.

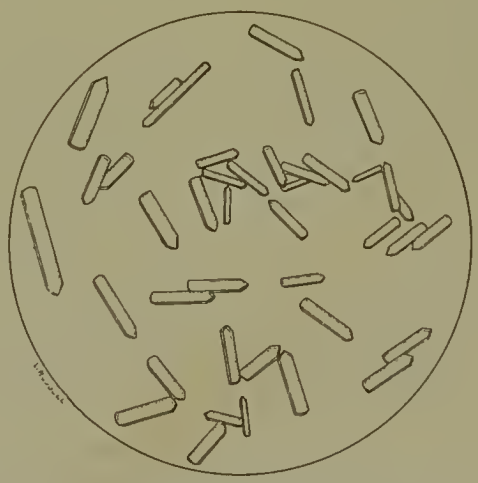


Fig. 28. — Sérum-albumine cristallisée.

Pour obtenir ces cristaux, on ajoute à 20 centimètres cubes de sérum frais de cheval un égal volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, afin de séparer la globuline. Le liquide filtré, limpide, est additionné goutte à goutte de sulfate d'ammonium jusqu'à commencement de précipitation, puis le louche redissous au moyen de quelques gouttes d'eau. On verse alors, en agitant, de l'acide sulfurique normal jusqu'à ce que le trouble formé ne se redissolve plus, et on abandonne au frais. Il se produit peu à peu un précipité qui, après

12 à 24 heures, se montre formé de cristaux caractéristiques, en forme de nacelles (*fig.* 28). Si l'addition d'acide sulfurique déterminait de suite un abondant précipité, on redissoudrait celui-ci avec quelques gouttes d'ammoniaque diluée, puis on ajouterait de nouveau l'acide normal jusqu'à trouble léger persistant.

276. — *Cristallisation de l'ovalbumine.* On peut faire cristalliser cette albumine de la manière suivante : au liquide filtré après la précipitation de la globuline, on ajoute goutte à goutte de l'acide acétique à 10 $^0/_0$, avec précaution, jusqu'à ce que le précipité formé ne se redissolve plus par agitation ; on ajoute alors $0^{cm3},1$ de solution acide par 10 centimètres cubes de liquide ; il se produit un abondant précipité, qui devient cristallin du jour au lendemain.

On doit examiner au microscope à un fort grossissement (obj. 8, ocul. 2).

Si on fait tomber quelques gouttes de cette suspension de cristaux dans une solution de chlorure mercurique à 1 $^0/_0$, les cristaux sont insolubilisés et gardent leur forme ; on peut en faire des préparations stables, les colorer, etc.

Toutefois la cristallisation de l'ovalbumine ne réussit qu'à la condition d'opérer avec des œufs absolument frais.

Préparation du fibrinogène

277. — Le fibrinogène est une protéine du type des globulines, qui se trouve dans le plasma sanguin et se transforme en fibrine pendant la coagulation du sang.

Pour la préparer, on part du plasma fluoré. On recueille directement du sang de cheval, à la saignée, dans un flacon contenant autant de fois 100 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 3 °/₀ que l'on veut recueillir de litres de sang.

Cette précaution a pour but de rendre le sang incoagulable. On laisse déposer les globules, ou mieux on centrifuge, on décante le plasma limpide coloré en jaune qui surnage les globules, et on l'additionne d'un volume de solution saturée de chlorure de sodium contenant 0,3 °/₀ de fluorure de sodium. Le fibrinogène se précipite en flocons qui se rassemblent en grumeaux gélatineux.

Pour le purifier, on exprime le précipité, recueilli sur une mousseline, puis on le redissout dans la plus petite quantité possible d'une solution contenant 1 °/₀ de chlorure de sodium et 0,3 °/₀ de fluorure et on filtre. Le filtrat est précipité à nouveau par un volume de solution saturée de sel. On recommence une ou deux fois cette purification, enfin on redissout le fibrinogène en le mettant en suspension dans un peu d'eau ; il repasse en solution à la faveur de la petite quantité de sel qu'il renferme. Cette solution se coagule en flocons quand on chauffe vers 55-56° ; d'autre part, elle coagule en un caillot gélatineux transparent et rétractile par le fibrine-ferment (voir § **423**).

Protéines végétales

278. — La plupart des protéines végétales, extraites des graines, ressemblent aux globulines animales ; elles

se dissolvent en général dans les solutions de chlorure de sodium à 10 %, et en sont précipitées soit par dilution, soit par dialyse. Elles diffèrent des globulines animales en ce que la plupart d'entre elles ne précipitent pas par saturation avec le sulfate de magnésium ou par demi-saturation avec le sulfate d'ammonium ; de plus elles coagulent très incomplètement ou ne coagulent pas du tout par le chauffage de leur solution.

Un certain nombre de protéines végétales se distinguent par leur solubilité dans l'alcool éthylique à 70-80 %, soit à chaud, soit à la température ordinaire, et doivent être groupées à part.

Préparation de l'édestine

279. — Les graines de chanvre ou chènevis renferment, à côté d'une certaine quantité de matière grasse, environ 13 % d'une globuline insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions salines étendues, l'édestine (Ritthausen, Osborne).

Pour préparer l'édestine, on triture au mortier 100 grammes de chènevis, de manière à le broyer aussi bien que possible, et on introduit la masse dans une allonge de verre fermée à sa partie inférieure par un robinet, au-dessus duquel est un tampon de coton hydrophile. On verse assez d'éther de pétrole pour recouvrir le chènevis et on laisse en contact une demi-heure.

On ouvre alors le robinet pour laisser couler le liquide qui s'est chargé de graisse ; on le referme ensuite, on remet une nouvelle quantité d'éther de pétrole

et on recommence l'épuisement. Après cinq ou six opérations semblables, on fait tomber les graines dégraissées sur une feuille de papier, on les sèche à l'étuve à 35° et on les broie de nouveau. On peut alors, au moyen d'un tamis, séparer la farine des fragments d'enveloppe.

On prend 50 grammes de farine et on les introduit dans un flacon avec 140 centimètres cubes de solution de chlorure de sodium à 10 °/₀ et 10 centimètres cubes d'eau de baryte saturée à froid ; on agite bien, et on laisse en contact pendant deux heures en remuant de temps à autre.

On essore ensuite à la trompe, en repassant les premières parties troubles, et on a un liquide limpide, légèrement acide, coloré en jaune brun, qui renferme l'édestine. Le résidu resté sur le filtre est détaché et broyé avec 50 centimètres cubes de chlorure de sodium à 10 °/₀ ; on essore à nouveau et on réunit le liquide filtré au précédent.

Pour séparer l'édestine, on dialyse le liquide, placé dans un tube de papier parchemin, ou dans un sac de papier parchemin que l'on fait facilement en relevant les bords d'une feuille carrée d'environ 40 centimètres de côté, et en les attachant au moyen d'une ligature solide, sur un gros tube de 3 à 4 centimètres de diamètre. On suspend le dialyseur dans un cristallisoir, de manière que le niveau du liquide intérieur corresponde à celui du bord du cristallisoir, et on fait couler dans ce dernier un filet d'eau continu ; l'eau qui déborde du cristallisoir s'écoule ensuite dans l'évier.

Après trois à quatre jours, la totalité du chlorure de sodium est enlevée par dialyse et on trouve l'édestine, sous forme d'un précipité cristallin, au fond du dialyseur.

On essore, on lave à l'eau distillée, et on sèche à basse température.

280. — *Cristallisation de l'édestine.* Pour faire cristalliser l'édestine, on délaie la masse encore humide dans une quantité convenable de solution de chlorure de sodium à 10 $^0/_0$, afin que la concentration en édestine soit d'environ 8 $^0/_0$ (soit à peu près 80 centimètres

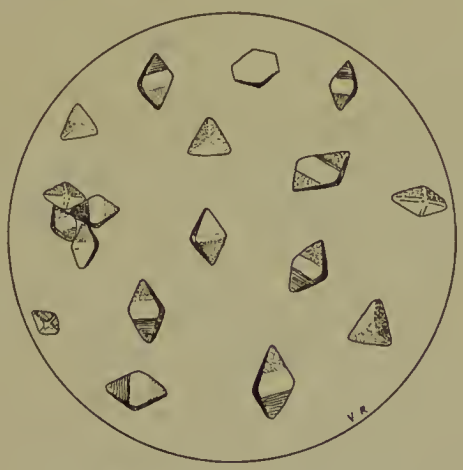


Fig. 29. — Edestine cristallisée.

cubes pour les quantités indiquées). La solution est filtrée, chauffée à 60° et additionnée peu à peu, en agitant, de 2 fois son volume d'eau chauffée à la même température. On laisse refroidir le liquide, puis on le maintient pendant quelques heures à la glacière; l'édestine se dépose peu à peu en cristaux.

Lorsque l'on veut simplement observer des cristaux d'édestine, on broie au mortier 5 grammes de chènevis et on les fait macérer pendant une demi-heure dans un bain-marie réglé à 60°, avec 25 à 30 centimètres cubes

de chlorure de sodium à 5 $^0/_0$. On filtre et on abandonne à un refroidissement très lent. L'édestine se dépose en octaèdres facilement reconnaissables au microscope (*fig.* 29).

Extraction du gluten
Séparation de la gliadine et de la gluténine

281. — La farine de blé est formée essentiellement d'amidon (70 $^0/_0$) et d'une matière azotée qui constitue le gluten (8 à 12 $^0/_0$). Celui-ci est un mélange de deux protéines, la gliadine, caractérisée par sa solubilité dans l'alcool, et la gluténine insoluble dans l'eau et dans l'alcool froids, mais soluble dans les solutions alcalines très diluées.

282. — *Extraction du gluten.* On mélange dans un mortier 50 grammes de farine avec juste assez d'eau froide pour faire une pâte très consistante que l'on pétrit en forme de boule. Celle-ci est malaxée dans les mains, sous un mince filet d'eau ; le liquide se trouble en entraînant l'amidon qui disparaît peu à peu. Lorsque l'eau qui s'écoule est à peine trouble, on divise et on malaxe la pâte élastique, en continuant le lavage jusqu'à entraînement aussi complet que possible de l'amidon. Le résidu, qui constitue le gluten humide, forme une masse grisâtre, molle et élastique, que l'on peut sécher.

283. — *Préparation de la gliadine.* Le gluten encore humide est essuyé avec du papier à filtrer et divisé en petits fragments que l'on fait tomber dans de l'alcool. La concentration la plus convenable de l'alcool pour

dissoudre la gliadine est 70 $^0/_0$; pour 10 grammes de gluten humide, qui contiennent environ 6 à 7 grammes d'eau (soit les 2/3), on prendra donc 30 centimètres cubes d'alcool à 96° et 5 centimètres cubes d'eau. On chauffe dans un petit ballon muni d'un réfrigérant ascendant, sur le bain-marie, en agitant souvent, et on laisse digérer dans l'alcool chaud pendant vingt-quatre heures. L'alcool est alors décanté et remplacé par de l'alcool à 70° ; on laisse de nouveau digérer et on recommence le traitement aussi longtemps que l'alcool dissout une quantité notable de substance. Les solutions alcooliques réunies et filtrées sont concentrées dans le vide ; à la fin, on ajoute un peu d'alcool pour redissoudre le trouble formé, et on verse le liquide en mince filet, en agitant, dans 8 fois son volume d'eau froide. La gliadine précipitée est recueillie, lavée à l'eau et séchée. Elle forme de 60 à 80 $^0/_0$ du gluten.

284. — *Préparation de la gluténine.* Le résidu de l'extraction par l'alcool à 70° constitue la gluténine. Pour la purifier, on sèche ce résidu, on le pulvérise et on l'épuise par l'alcool. La poudre est alors agitée avec 30 à 50 centimètres cubes de solution de potasse à 2 grammes par litre ; après dissolution complète, on filtre et on neutralise par l'acide chlorhydrique très dilué. La gluténine qui se précipite est recueillie sur un filtre, lavée et séchée.

Recherche de l'albumine dans l'urine

285. — Faire bouillir 10 centimètres cubes d'urine filtrée et claire dans un tube à essai. Si le liquide reste

limpide, il n'y a pas d'albumine. S'il se produit un trouble ou un précipité floconneux, cela peut être dû à la présence d'albumine coagulée ou de phosphates alcalino-terreux. Ces derniers, solubles dans l'eau chargée d'acide carbonique, se précipitent, en effet, quand on chasse le gaz par ébullition.

Pour établir la distinction, on ajoute une seule goutte d'acide acétique, qui redissout instantanément les phosphates, mais laisse subsister le trouble ou le précipité d'albumine.

286. — Dans certains cas, l'urine, de faible densité, est trop pauvre en sels pour que la coagulation de l'albumine se produise ou, si elle se produit, le coagulum peut se redissoudre dans l'acide acétique. Il faut alors ajouter, avant de poursuivre la recherche, environ 1 $^0/_0$ de chlorure de sodium et filtrer s'il est nécessaire. En règle générale, il serait donc préférable d'ajouter toujours à l'urine cette proportion de chlorure de sodium avant de procéder à la recherche.

287. — On complétera cet essai par la recherche de l'albumine au moyen de l'acide nitrique, à froid, comme il est indiqué au § **264**. Certaines urines, riches en urates et ne renfermant pas d'albumine, peuvent donner, avec l'acide nitrique, une zone trouble qui pourrait faire croire à la présence d'une trace d'albumine. On éliminera cette cause d'erreur en diluant au préalable l'urine de son volume d'eau. De cette manière, on n'a plus à craindre la précipitation de l'acide urique. S'il se produit un trouble, il sera certainement dû à de l'albumine.

Dosage de l'albumine dans l'urine

288. On effectuera ce dosage sur 25 à 100 centimètres cubes d'urine filtrée, suivant la richesse présumée, d'après l'essai qualitatif ci-dessus.

A ce volume de liquide, placé dans un vase de Bohême, on ajoute 1 % de sel marin, puis de 1 à 4 gouttes d'acide acétique, et on chauffe au bain-marie jusqu'à coagulation, que l'on complète en portant le liquide à l'ébullition pendant un instant. On laisse déposer le précipité, on décante le liquide surnageant sur un filtre sans plis, on délaie le précipité dans 50 centimètres cubes d'eau bouillante, on laisse déposer à nouveau, on décante, on jette le précipité sur le filtre, et on le lave à fond avec de l'eau chaude jusqu'à ce que le liquide filtré ne se trouble plus par le nitrate d'argent [1].

Avec le jet de la pissette, on rassemble avec soin tout le précipité au fond du filtre ; on enlève ce dernier de l'entonnoir et on le pose sur un peu de papier à filtrer pour absorber l'excès d'eau.

Quand le filtre et le précipité sont bien essorés, on peut facilement, avec une spatule, les séparer l'un de l'autre. On place alors le petit bloc d'albumine dans une capsule tarée, on sèche à l'étuve et on pèse. Ce précipité renferme une très petite quantité de matières minérales que l'on peut déduire après calcination.

---

[1] On peut utiliser la centrifugation pour recueillir et laver le précipité d'albumine.

On rapporte habituellement le résultat trouvé au litre.

289. — Lorsque le précipité est minime, on peut, au lieu de le peser, y doser l'azote par la méthode de Kjeldahl (§ **37**) et multiplier le résultat obtenu par le coefficient 6,25. Il est inutile, si on a opéré par filtration, de séparer le précipité du filtre; on attaque le tout ensemble par l'acide sulfurique. Pour le titrage, prendre de l'acide décinormal.

CHAPITRE XIII

PRODUITS D'HYDROLYSE DES PROTÉINES

Principaux produits de dédoublement des protéines

ACIDES MONOAMINÉS :

Glycine (glycocolle) ..... CH^2NH^2-COOH
Alanine ..... CH^3-$CHNH^2$-COOH
Valine (ac. amino-valérique) ..... C^3H^7-$CHNH^2$-COOH
Leucine ..... C^4H^9-$CHNH^2$-COOH
Sérine ..... CH^2OH-$CHNH^2$-COOH
Acide aspartique ..... COOH-CH^2-$CHNH^2$-COOH
— glutamique ..... COOH-$(CH^2)^2$-$CHNH^2$-COOH

ACIDES DIAMINÉS :

Lysine ..... CH^2NH^2-$(CH^2)^3$-$CHNH^2$-COOH
Arginine ..... NH^2-CNH-NH-$(CH^2)^3$-$CHNH^2$-COOH

ACIDE THIOAMINÉ :

Cystine ..... COOH-$CHNH^2$-$(CH^2S)^2$-$CHNH^2$-COOH

CORPS CYCLIQUES :

Phénylalanine ..... C^6H^5-CH^2-$CHNH^2$-COOH
Tyrosine ..... C^6H^4.OH-CH^2-$CHNH^2$-COOH
Proline ..... C^4H^8N-COOH
Oxyproline ..... C^4H^7N.OH-COOH
Histidine ..... $C^3H^3N^2$-CH^2-$CHNH^2$-COOH
Tryptophane ..... C^8H^6N-CH^2-$CHNH^2$-COOH

Hydrolyse acide des substances protéiques du sérum

290. — Les albumines et globulines solubles sont coagulées par les acides minéraux ; si on chauffe, le coagulum se redissout en se transformant en acidalbumine ; il y a ensuite formation d'albumoses, puis de peptones ; on obtient finalement un mélange d'acides mono et polyaminés. La formation de ces produits est directement en rapport avec la durée du chauffage.

291. — Pour étudier la marche de l'hydrolyse, on introduit, dans un ballon de 200 centimètres cubes de capacité, 50 centimètres cubes de sérum sanguin (de bœuf ou de cheval, par exemple), et 6 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré (ce qui correspond à 20 $^0/_0$ en poids, à peu près). On bouche avec un bouchon de liège portant un long tube de verre qui sert de réfrigérant et on porte à l'ébullition, en agitant sans cesse et en veillant à ce que la mousse n'atteigne pas le réfrigérant.

292. — Après dix minutes, on retire du feu, et on prélève 10 centimètres cubes de liquide, auxquels on ajoute 6 grammes d'hydrate de baryum cristallisé, dissous dans le moins possible d'eau bouillante (20 centimètres cubes). On vérifie que le liquide est légèrement acide (aciduler au besoin par l'acide sulfurique étendu) et on filtre.

Le liquide donne nettement la réaction du biuret ; un essai, saturé à froid de sulfate d'ammonium cristal-

lisé, donne un précipité, dû à la présence d'albumoses ; la formation d'un précipité bleu, par addition d'une solution saturée d'acétate cuivrique dans un deuxième essai, montre qu'il s'agit d'albumoses primaires.

293. — L'hydrolyse, interrompue après dix minutes, est reprise ; le chauffage est poursuivi pendant une heure ; après ce temps, on prélève 10 centimètres cubes de liquide, que l'on traite comme plus haut.

L'absence de précipité par le sulfate d'ammonium à saturation et par l'acétate cuivrique indique qu'il n'y a plus d'albumoses ; en revanche, la réaction du biuret, très intense, montre la présence des peptones.

294. — Le reste du liquide est maintenu à l'ébullition lente pendant six à huit heures ; après ce temps, on ne constate plus aucune réaction du biuret, donc les peptones ont disparu. Le liquide est additionné d'une solution saturée et bouillante d'hydrate de baryum, de manière à ce que la réaction devienne nettement alcaline ; on chauffe à l'ébullition en agitant sans cesse, et on constate le dégagement d'ammoniaque. Lorsque ce dégagement a cessé, on ajoute assez d'acide sulfurique, goutte à goutte, pour rendre le liquide nettement acide, et on filtre. Le liquide filtré additionné de 5 $^0/_0$ d'acide sulfurique et d'une solution d'acide phosphotungstique à 5-10 $^0/_0$, donne un précipité dû à la présence des acides diaminés. Ce précipité étant séparé par filtration, on ajoute au liquide restant une solution de sulfate de cuivre, puis assez de soude pour le rendre légèrement alcalin ; on obtient par chauf-

fage au bain-marie un liquide coloré en bleu foncé par les combinaisons cuivriques des acides monoaminés.

Réactions des acidalbumines et des alcalialbumines

295. — Lorsqu'on fait agir sur les protéines un acide ou un alcali, on les transforme en corps mal définis auxquels on donne par convention le nom d'acidalbumines ou d'alcalialbumines. Ces corps sont insolubles dans l'eau et dans les solutions des sels neutres; ils sont incoagulables par la chaleur.

296. — Les acidalbumines restent en dissolution à la faveur d'un excès d'acide. Lorsqu'on ajoute peu à peu un alcali, la substance précipite au moment où la neutralisation est atteinte, mais elle se redissout dans un excès d'alcali.

297. — Inversement, les alcalialbumines, dissous dans un excès d'alcali, précipitent lorsqu'on neutralise leur solution par un acide, et le précipité se redissout si on verse un excès d'acide.

Caractères des albumoses et des peptones

298. — Les albumoses et les peptones sont solubles dans l'eau [1] et non coagulables par la chaleur. Les

---

[1] A l'exception des hétéro-albumoses, qui ne se dissolvent qu'en présence d'une petite quantité de sels neutres.

Réactions des protéines, albumoses et peptones.

	PROTÉINES	ALBUMOSES		PEPTONES
		PRIMAIRES	SECONDAIRES	
Chaleur, en milieu légèrement acétique.....	Coagulation	Pas de coagulation	Pas de coagulation	Pas de coagulation
Sulfate d'ammonium ...	Précipité en milieu neutre	Précipité à 1/2 saturation, en milieu acétique.	Précipité à saturation, en milieu acétique.	Pas de précipité
Acide nitrique.....	Coagulation	Précipité, soluble à chaud, reparaît à froid.	Pas de précipité (1)	Pas de précipité (2)
Ferrocyanure de potassium et acide acétique.	Précipité blanc	id.	id.	id.
Acétate de cuivre.....	Coagulation	Précipité bleu	id.	id.
Chlorure mercurique (sol. saturée).....	id.	Précipité blanc	Précipité blanc	Précipité blanc (en partie)
Acétate de plomb.....	id.	id.	id.	id.
Acide picrique (sol. sat.).	Précipité jaune	Précipité jaune	Précipité jaune	Précipité jaune dans les sol. conc.
Acide phosphotungstique en milieu sulfurique..	Précipité blanc	Précipité blanc	Précipité blanc	Précipité blanc

(1) A moins que l'on n'opère en milieu saturé de sel marin. (2) Même en solution saturée de sel marin.

premières se précipitent de leurs solutions aqueuses, acidifiées par l'acide acétique, par saturation avec le sulfate d'ammonium, les secondes ne précipitent pas. Pour rechercher ces produits de dédoublement dans une peptone commerciale, on dissoudra 5 à 10 grammes de celle-ci dans 50 centimètres cubes d'eau, on acidulera avec deux gouttes d'acide acétique et on ajoutera dans le liquide du sulfate d'ammonium pulvérisé, en agitant pour favoriser la dissolution. Quand il reste un petit excès de sel non dissous, la saturation est complète, et la presque totalité des albumoses est précipitée. On filtre, et dans le liquide on recherche la présence des peptones vraies par la réaction du biuret. On peut utiliser cette solution pour étudier les caractères des peptones.

299. — Le précipité resté sur le filtre est lavé avec la solution saturée de sulfate d'ammonium, puis égoutté et essoré entre des feuilles de papier à filtrer. On le redissout ensuite dans quelques centimètres cubes d'eau, et l'on utilise cette solution pour l'étude des caractères des albumoses que l'on trouvera résumés dans le tableau ci-contre.

Caractères généraux des acides aminés

300. — Les acides α-aminés qui résultent de l'hydrolyse des substances protéiques sont des solides plus ou moins solubles dans l'eau ; un certain nombre possèdent une saveur sucrée (glycocolle, alanine).

301. — Chauffés sur le bain-marie avec un peu

d'eau et de l'hydrate ou du carbonate de cuivre, ils dissolvent ces derniers en donnant des sels dont les solutions sont colorées en bleu foncé.

302. — Leur solution aqueuse, neutralisée en présence de phénolphtaléine, et additionnée d'une solution concentrée et bien neutre d'aldéhyde formique, donne un mélange très nettement acide.

Préparation du glycocolle (ou glycine)

303. — On l'obtient facilement dans l'hydrolyse de la gélatine ou de la soie. On chauffe à l'ébullition, dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, 20 grammes de gélatine avec 60 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré, jusqu'à ce que l'hydrolyse soit totale, ce qui exige sept à huit heures environ. Après ce temps, on prélève 2 centimètres cubes de liquide, on y ajoute 5 à 10 centimètres cubes de solution étendue de nitrate d'argent, et on filtre. Le liquide filtré, presque incolore, ne doit plus donner la réaction du biuret. Dès que ce résultat est obtenu, on verse le liquide dans une capsule et on évapore à sirop sur le bain-marie. Le résidu chaud est repris aussitôt par 50 à 60 centimètres cubes d'alcool absolu et éthérifié au moyen d'un courant de gaz chlorhydrique sec que l'on y fait passer jusqu'à saturation. On doit agiter de temps à autre pour obtenir une dissolution totale. Lorsque le liquide est saturé, on le chauffe un instant jusqu'à l'ébullition, puis on le refroidit à 0° au moyen de glace. Après vingt-quatre heures, on trouve

des cristaux de chlorhydrate d'éther de glycocolle que l'on essore à la trompe et qu'on lave avec un peu d'alcool froid. Après dessiccation, ces cristaux fondent à 144°.

Pour obtenir le glycocolle, on décompose le chlorhydrate d'éther, redissous dans peu d'eau, en chauffant avec un léger excès d'hydrate de plomb précipité. On évapore à sec et on reprend par l'eau froide, qui dissout le glycocolle. On filtre, on précipite exactement le plomb par addition d'acide sulfurique étendu, goutte à goutte, on filtre à nouveau, et on concentre jusqu'à cristallisation.

Caractères du glycocolle (ou glycine)

304. — Le glycocolle se présente en cristaux de saveur sucrée, solubles dans l'eau, précipitables de cette solution par l'alcool lorsqu'elle n'est pas trop étendue.

La solution aqueuse se colore en rouge par le chlorure ferrique, comme celle des formiates et acétates.

305. — Si on chauffe légèrement la solution aqueuse de glycocolle avec de l'hydrate de cuivre, celui-ci se dissout en donnant une solution bleu foncé ; le liquide filtré et suffisamment concentré donne une cristallisation de glycocollate de cuivre en aiguilles bleues de formule $(C^2H^4NO^2)^2Cu + H^2O$, laissant par calcination 34,67 % d'oxyde de cuivre.

306. — Les solutions aqueuses de glycocolle, additionnées de phénol et d'hypochlorite de sodium,

donnent une coloration bleu foncé. La réaction est analogue à celle que donne l'ammoniaque dans les mêmes conditions (§ **531**), mais elle est beaucoup moins sensible. Pour l'obtenir, on ajoute à 5 centimètres cubes de solution de glycocolle 1 centimètre cube de phénol en solution à 3 ou 4 $^0/_0$, on mélange, puis on verse une à deux gouttes d'eau de Javel (extrait concentré du commerce). Il se développe peu à peu une teinte bleue.

Caractères de l'acide hippurique

307. — L'acide hippurique ou benzoyl-glycocolle cristallise en longues aiguilles brillantes, solubles dans 600 parties d'eau froide, très solubles à chaud. Il fond à 187-188° et donne, si on chauffe davantage, un sublimé d'acide benzoïque, en même temps qu'il se dégage une odeur aromatique accompagnée de celle de l'acide cyanhydrique.

308. — Par hydrolyse, il fournit de l'acide benzoïque et du glycocolle :

$$C^6H^5\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH^2\text{-}COOH + H^2O = C^6H^5\text{-}COOH + NH^2\text{-}CH^2\text{-}COOH$$

Pour constater la production d'acide benzoïque, il suffit de chauffer 1 gramme d'acide hippurique avec 10 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 10 $^0/_0$ pendant vingt minutes à l'ébullition. L'acide benzoïque cristallise par refroidissement en longues aiguilles. Il est facile de l'extraire au moyen de l'éther; on peut le caractériser par son point de fusion (121° 5).

Caractères de la leucine

309. — Une petite quantité de leucine, chauffée dans un tube à essai bien sec, se sublime en partie sur les parois du tube. Si on chauffe un peu plus, il se développe des fumées blanches et on perçoit une odeur caractéristique d'amylamine.

Caractères de l'acide aspartique

310. — Cet acide se produit dans l'hydrolyse acide de l'asparagine (voir § **323**). Il donne avec les sels de plomb un précipité blanc très peu soluble, cristallisé en aiguilles. Sa solution, additionnée d'une solution saturée d'acétate de cuivre, donne au bout de quelques instants un précipité bleu ciel d'aspartate cuivrique cristallisé en aiguilles de composition $C^4H^5CuNO^4 + 5H^2O$.

Préparation de l'acide glutamique

311. — Ce corps se produit en abondance par l'hydrolyse des substances protéiques végétales qui forment le gluten. Pour le préparer, on porte à l'ébullition pendant environ huit heures 20 grammes de gluten desséché avec 100 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur à 22° B. dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant. La partie supérieure du réfrigérant porte un tube recourbé verticalement qui pénètre dans un ballon contenant de l'eau ; l'extrémité arrive à 1 ou 2 cen-

timètres au-dessus de la surface du liquide, destiné à absorber le gaz chlorhydrique qui se dégage pendant l'opération. Lorsque l'hydrolyse est terminée, on fait refroidir le liquide, qui est maintenu à 0° au moyen de glace, et on y fait passer un courant de gaz chlorhydrique de manière à le saturer complètement. On abandonne pendant vingt-quatre heures; il se produit une abondante cristallisation du chlorhydrate de l'acide glutamique, très peu soluble dans l'acide chlorhydrique concentré (Hlasiwetz et Habermann).

312. — Si on veut isoler l'acide, on opère comme il suit. Les cristaux essorés sont lavés avec un peu d'acide chlorhydrique pur, redissous dans peu d'eau, et le liquide saturé par un lait de chaux. On évapore à sec au bain-marie et on reprend par l'alcool à 96° bouillant, qui ne dissout que le chlorure de calcium. Après avoir épuisé la poudre restante par l'alcool, on la redissout dans peu d'eau bouillante et on ajoute une solution d'acide oxalique, avec précaution, tant qu'il se fait un précipité d'oxalate de calcium. Le liquide, filtré et évaporé fortement, laisse cristalliser l'acide glutamique (P. Thomas).

Caractères de la phénylalanine

313. — La phénylalanine se transforme facilement, par oxydation, en aldéhyde phénylacétique

$$C^6H^5\text{-}CH^2\text{-}CHO,$$

dont l'odeur est nettement cinnamique et rappelle celle

du baume de tolu. Pour caractériser la phénylalanine, on chauffe dans un tube à essai une petite quantité de ce corps avec 2 centimètres cubes d'eau, 10 gouttes d'acide sulfurique concentré et un cristal de bichromate de potassium. Le liquide brunit et on perçoit bientôt l'odeur d'aldéhyde phénylacétique (E. Fischer).

Caractères de la tyrosine

314. — La tyrosine est un acide aminé possédant une fonction phénolique ; sa formule est :

$$C^6H^4 \begin{cases} OH \\ CH^2\text{-}CH.NH^2\text{-}COOH. \end{cases}$$

Elle cristallise en très fines aiguilles blanches, groupées en gerbes ou en rosaces, et faciles à reconnaître au microscope (ocul. 2. obj. 8). Pour observer ces cristaux, on placera sur une lame de verre une goutte de solution ammoniacale de tyrosine et on abandonnera à l'évaporation spontanée (*fig.* 30). Ne pas oublier de vérifier la solubilité des cristaux dans l'acide chlorhydrique concentré et dans l'ammoniaque.

315. — *Réaction de Millon.* La tyrosine est très peu soluble dans l'eau (environ $0^{gr},5$ par litre), à la température ordinaire. Malgré cela, 1 centimètre cube de sa solution aqueuse suffit pour donner avec intensité la réaction de Millon. Il faut chauffer très légèrement ; si on chauffe trop, la coloration rouge disparaît et fait place à une teinte jaune.

316. — *Réaction de la tyrosinase.* La tyrosine s'oxyde rapidement à l'air en présence de cette diastase. 5 centimètres cubes de solution aqueuse saturée de tyrosine, additionnés de 3 à 5 gouttes de macération glycérinée de champignons riche en tyrosinase (voir § **439**), se colorent plus ou moins vite en rouge (5 à 15 minutes). La teinte passe au brun noir après quelques heures (G. Bertrand).

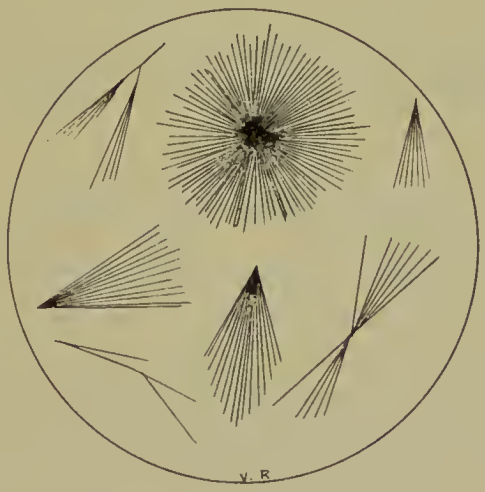


Fig. 30. — Cristaux de tyrosine.

317. — *Réaction de Piria.* On dissout un peu de tyrosine dans une ou deux gouttes d'acide sulfurique concentré, placées au fond d'un tube à essai, et on chauffe au bain-marie pendant une dizaine de minutes. On étend de 2 à 3 centimètres cubes d'eau, on neutralise l'acide en faisant bouillir avec une pincée de carbonate de baryum et on filtre. La solution incolore et limpide de tyrosine-sulfonate de baryum donne, par addition d'une goutte de solution étendue de chlorure ferrique, une belle coloration violette.

Réactions du tryptophane

318. — Le tryptophane est mis en liberté dans la digestion trypsique des substances protéiques. Libre ou combiné, il donne nettement la réaction glyoxylique (voir § **269**). De plus, lorsqu'il est libre, il donne la réaction suivante : si à la solution qui le renferme on ajoute goutte à goutte de l'eau de brome, il se fait une coloration rouge violacé, puis un précipité lie de vin. La coloration disparaît assez rapidement.

Dosage des acides aminés

319. — Les acides aminés provenant de l'hydrolyse des substances protéiques possèdent tous le groupement caractéristique — $CHNH^2$ — COOH ; ils fonctionnent comme acides en présence des bases énergiques, comme bases en présence des acides forts Lorsqu'ils se trouvent en contact avec le formaldéhyde, il y a réaction et le groupement aminé se trouve bloqué ; on a :

$$R\text{-}CH \begin{cases} COOH \\ NH^2 \end{cases} + CH^2O = R\text{-}CH \begin{cases} COOH \\ N{=}CH^2 \end{cases} + H^2O$$

Le dérivé méthylénique ainsi obtenu se comporte comme un acide énergique et peut être titré par un dosage acidimétrique en présence de phtaléine. Cette réaction est utilisée pour le dosage des acides aminés (Sörensen).

320. — Pour doser le glycocolle, par exemple, contenu dans une solution, on mesure exactement 10 centimètres cubes de celle-ci, on y verse 2 à 3 gouttes de phtaléine, puis on neutralise. On ajoute alors 20 centimètres cubes d'un mélange préparé avec parties égales de solution commerciale de formol (à 40 $^0/_0$) et d'eau (ce mélange ayant été préalablement neutralisé exactement à la phtaléine au moyen de soude étendue, versée goutte à goutte). Le liquide devient aussitôt très acide et il suffit d'y faire couler de la soude décime contenue dans une burette, en agitant, jusqu'à coloration rose très nette. Chaque centimètre cube de soude décime correspond à $0^{gr},0075$ de glycocolle.

Avec les autres acides aminés, les quantités correspondant à la soude étant proportionnelles aux poids moléculaires, 1 centimètre cube de soude décime correspond à :

$0^{gr},0089$ d'alanine,
0 ,0131 de leucine,
0 ,0165 de phénylalanine,
0 ,0181 de tyrosine, etc.

321. — Lorsqu'on dose les acides aminés dans un mélange complexe contenant encore des protéines ou dans un liquide trouble provenant d'une digestion, il faut ajouter une proportion plus élevée d'indicateur ; le dosage devient alors un peu moins exact, sans perdre de sa commodité.

Si le liquide est trop coloré, le virage devient difficile à saisir ; on peut alors décolorer en grande partie le liquide en produisant, par addition successive de

nitrate d'argent et de chlorure de baryum (employé en excès), un précipité de chlorure d'argent qui fixe les matières colorantes.

Par exemple, pour 25 centimètres cubes de liquide coloré, on ajoute 10 à 12 centimètres cubes de nitrate d'argent à 10 $^0/_0$, puis la même quantité de chlorure de baryum à 10 $^0/_0$; on amène le volume à 50 centimètres cubes dans une fiole jaugée, on filtre, et on opère le titrage sur un volume exactement mesuré du liquide filtré.

CHAPITRE XIV

AMIDES

Caractères de l'asparagine

322. — L'asparagine est très répandue dans le règne végétal, en particulier dans les organes en voie de croissance rapide (bourgeons, germes).

Ce corps est l'amide de l'acide aspartique ; il se présente en beaux cristaux incolores et transparents, peu solubles dans l'eau froide (2 $^0/_0$ environ), beaucoup plus solubles à chaud.

La solution d'asparagine, additionnée d'acétate cuivrique en solution saturée, donne un précipité cristallin, bleu ciel, d'asparaginate de cuivre, apparaissant au bout d'un certain temps. Sa formation est favorisée par l'agitation.

Hydrolyse de l'asparagine et formation d'aspartate cuivrique

323. — On verse dans un tube à essai 10 centimètres cubes d'une solution d'asparagine à 2 $^0/_0$, on ajoute trois pastilles de potasse et on place au bain-marie

bouillant pendant vingt à trente minutes. Il se dégage de l'ammoniaque facile à reconnaître (odeur, papier de tournesol rouge qui bleuit). Au bout de ce temps, on neutralise exactement par l'acide acétique cristallisable, puis on ajoute 1 à 2 centimètres cubes d'une solution d'acétate cuivrique à 10 $^0/_0$; par refroidissement, on a une cristallisation d'aspartate de cuivre peu soluble, d'un beau bleu clair (favorisée par amorçage et agitation).

Dosage de l'asparagine

324. — On maintient pendant une heure au bain-marie bouillant un mélange de 20 centimètres cubes de la solution d'asparagine à doser avec 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré. L'asparagine est changée en acide aspartique et la moitié de l'azote qu'elle renferme donne du chlorure d'ammonium suivant la formule :

$$\begin{aligned} COOH\text{-}CHNH^2\text{-}CH^2\text{-}CONH^2 + HCl + H^2O \\ = COOH\text{-}CHNH^2\text{-}CH^2\text{-}COOH + NH^4Cl. \end{aligned}$$

On verse le liquide dans le ballon de l'appareil d'Aubin pour le dosage de l'ammoniaque, on ajoute les eaux de lavage du matras, puis assez d'eau pour amener le volume à 200 centimètres cubes, et enfin 10 centimètres cubes de lessive de soude. On fait bouillir et on titre le liquide ammoniacal qui distille, en présence d'orangé, au moyen d'acide sulfurique N/5, comme pour le dosage de l'azote. Chaque centimètre cube d'acide employé correspond à $3^{mgr},4$

d'ammoniaque ou à $0^{gr},030$ d'asparagine cristallisée $C^4H^8N^2O^3 + H^2O$.

Ce dosage n'a de valeur que si on ne se trouve pas en présence de corps susceptibles de donner de l'ammoniaque par chauffage avec l'acide chlorhydrique.

Caractères de l'urée. — Recherche de l'urée dans l'urine

325. — *Formation du nitrate d'urée.* Dans une petite capsule de porcelaine, on évapore au bain-marie 4 à 5 centimètres cubes d'urine jusqu'au volume de 1 centimètre cube environ (pas à sec). On refroidit et on ajoute 1 centimètre cube d'acide nitrique : il se produit immédiatement une masse cristalline blanche de nitrate d'urée, formée de lames transparentes (examiner au microscope).

326. — *Formation du biuret.* Dans un tube à essai, on chauffe une petite quantité d'urée ($0^{gr},10$ environ) jusqu'à fusion et on maintient un instant à cette température. Il se dégage de l'ammoniaque et la masse se solidifie ; le biuret se forme par la réaction :

$$2CO\begin{cases}NH^2\\NH^2\end{cases} = NH^3 + \begin{matrix}CO\begin{cases}NH^2\\NH\end{cases}\\CO\begin{cases}NH\\NH^2\end{cases}\end{matrix}$$

Laisser refroidir, puis reprendre le résidu blanc par 2 centimètres cubes d'eau ; chauffer légèrement au besoin pour dissoudre, puis ajouter 1 centimètre cube de soude à 10 % et, goutte à goutte, une solution de

sulfate de cuivre à 1 $^0/_0$: les premières gouttes produisent une coloration rose violacé, tirant ensuite sur le bleu par addition ultérieure du sel de cuivre.

Dosage de l'urée dans l'urine

327. — *Dosage par l'hypobromite.* Ce dosage est basé sur la décomposition de l'urée en acide carbonique, azote gazeux et eau, sous l'influence de l'hypobromite de sodium, d'après la réaction :

$$CO\begin{cases}NH^2\\NH^2\end{cases} + 3NaOBr + 2NaOH =$$
$$2N + Na^2CO^3 + 3NaBr + 3H^2O.$$

En milieu alcalin, l'azote se dégage seul ; on mesure son volume et on en déduit la richesse en urée.

On doit se rappeler qu'il ne se dégage ainsi que les 92/100 de l'azote de l'urée ; si on opère en présence de sucre, saccharose ou glucose, on obtient la totalité de l'azote correspondant à l'urée. On doit donc opérer en présence de sucre, ou bien multiplier le résultat trouvé par 100/92 ; il n'y a pas lieu de faire cette correction dans le cas des urines fortement diabétiques. Il faut savoir aussi que dans le dosage de l'urée contenue dans l'urine, il existe une cause d'erreur en plus due à ce que l'hypobromite décompose également d'autres substances azotées, les sels ammoniacaux, la créatinine, etc. On trouve donc un peu plus d'azote que n'en fournirait l'urée seule. Dans la pratique ordinaire, cette cause d'erreur, assez faible, est ordinairement négligée.

328. — L'appareil employé se compose d'une cloche à gaz graduée en centimètres cubes et dixièmes de centimètres cubes, portant un renflement au voisinage de l'ouverture, et d'une capacité totale d'environ 35 centimètres cubes (G. Bertrand). On commence par mouiller intérieurement la cloche, on l'égoutte et on y fait couler suivant une génératrice, au moyen d'une pipette, 10 centimètres cubes de la solution d'hypobromite [1], puis doucement et sans mélanger, 5 centimètres cubes d'une solution de soude à 4 °/₀ (soude normale) ou d'eau sucrée à 10 °/₀, qui surnage, et enfin 1 centimètre cube d'urine exactement mesurée, qui surnage à son tour les couches précédentes. Redressant l'uréomètre, on lit le volume total occupé par le liquide (*fig.* 31) et on note ce volume. On bouche solidement avec le pouce, on retourne deux ou trois fois pour mélanger et, quand le dégagement de gaz a cessé, on retourne l'instrument sur la cuve à eau, puis on retire le pouce et on laisse écouler l'excès d'hypobromite. On plonge complètement l'éprouvette,

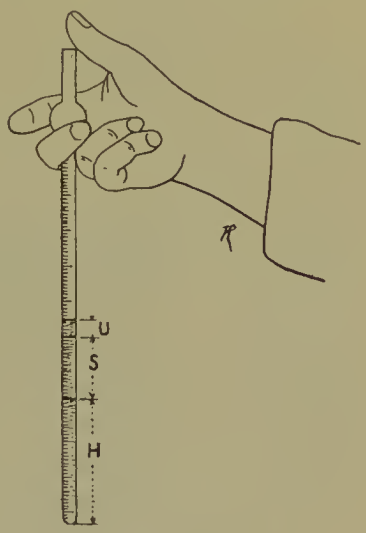


Fig. 31. — Uréomètre.

---

[1] La solution d'hypobromite s'obtient en faisant dissoudre 1 centimètre cube de brome dans 7 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B., préalablement étendue de 25 centimètres cubes d'eau.

maintenue inclinée, dans l'eau de la cuve, dont la température t doit être aussi peu éloignée que possible de celle du laboratoire. Redressant l'éprouvette, maintenue à l'aide d'une pince en bois, on fait coïncider

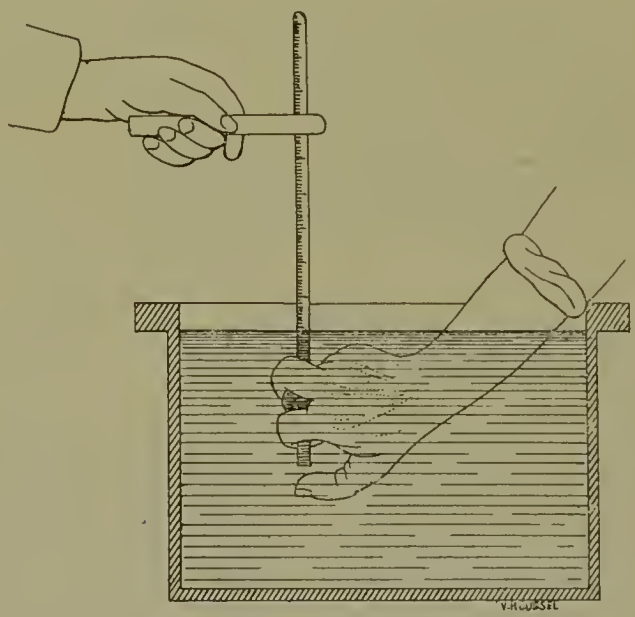


Fig. 32. — Manière de tenir l'uréomètre.

les niveaux à l'intérieur et à l'extérieur (*fig.* 32); le gaz est alors à la pression atmosphérique H, que l'on mesure à l'aide du baromètre, diminuée de la tension de la vapeur d'eau F à la température t (puisque le gaz est saturé de vapeur d'eau à cette température); cette tension est donnée par les tables (p. 455). Bouchant alors le tube avec le pouce, on le retire de l'eau, on le retourne, et on lit le volume occupé par le liquide qu'il renferme.

La différence entre ce volume et le volume total

occupé par le liquide avant la réaction représente exactement le volume d'azote mesuré à t° et à la pression H — F. Pour ramener ce volume à 0° et à 760 millimètres, on se sert de la formule :

$$V_0 = \frac{V_t}{1 + 0{,}00367t} \times \frac{H - F}{760}.$$

Le volume V_0, exprimé en centimètres cubes, et multiplié par 1,2511 (poids du litre d'azote à 0° et 760 millimètres) donne en milligrammes le poids d'azote obtenu. Ce poids doit être multiplié par le rapport 100/92, si l'on n'a pas opéré en présence de sucre. Le calcul est simplifié par l'emploi d'une table (p. 263).

D'après la réaction indiquée plus haut, on voit que 28 grammes d'azote correspondent à 60 grammes d'urée ; le poids obtenu doit donc être multiplié par 60/28 ; on obtient ainsi, en milligrammes, la quantité d'urée correspondant à 1 centimètre cube d'urine, ce qui correspond à l'urée en grammes par litre.

On se contente souvent, pour aller plus vite, de multiplier le volume d'azote ramené à 0° et à 760 millimètres par le coefficient 2,91 (ou 2,68 si on opère en présence de sucre). Ces coefficients peuvent être aisément déduits du calcul ci-dessus.

329. — *Dosage par transformation en ammoniaque.* Lorsque l'on veut doser l'urée avec exactitude, on ne peut employer la méthode à l'hypobromite. Le meilleur procédé repose sur la transformation de l'urée en ammoniaque par chauffage avec une solution concentrée de chlorure de magnésium, qui ne réagit, contraire-

ment à l'hypobromite, ni sur les acides urique et hippurique, ni sur la créatinine (Folin). Si on déduit de la quantité d'ammoniaque trouvée celle qui existe toute formée dans l'urine, on a tous les éléments pour le calcul de la quantité d'urée présente.

330. — On mesure exactement 5 centimètres cubes d'urine que l'on fait couler dans une fiole conique, et on ajoute 20 grammes de chlorure de magnésium cristallisé et 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré. On adapte à la fiole un bouchon de caoutchouc muni d'un tube de verre de 20 à 25 centimètres de long sur 8 à 10 millimètres de diamètre, taillé en biseau à sa partie inférieure, qui sert de réfrigérant, et on chauffe. La masse fondue commence bientôt à bouillir et les gouttes de liquide qui se condensent dans le tube retombent dans la fiole en produisant un grésillement très net. On maintient une lente ébullition pendant *une heure*, en ayant soin d'ajouter par le tube, de temps à autre, une ou deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré, afin de compenser la perte qui se produit toujours. Il est bon d'ajouter en même temps une goutte d'hélianthine, pour s'assurer que la réaction reste nettement acide. Il faut en effet éviter l'alcalinité, qui produirait une perte d'ammoniaque.

L'hydrolyse terminée, on verse le contenu de la fiole dans le ballon de l'appareil d'Aubin, on lave à l'eau à plusieurs reprises, et on amène le volume à un quart de litre environ. On ajoute 5 centimètres cubes de lessive de soude pure à 36° B., et on distille jusqu'à ce qu'il ne passe plus d'ammoniaque. On titre avec l'acide sulfurique N/5, comme au § **40**.

Comme la lessive de soude et le chlorure de magnésium employés peuvent contenir de petites quantités d'ammoniaque, il est bon de faire un essai à blanc et de déduire, du résultat obtenu, s'il y a lieu, la quantité apportée par les réactifs.

Le résultat corrigé doit, en tout cas, être diminué de la quantité d'ammoniaque contenue normalement dans l'urine et déterminée d'après le § **537**.

En multipliant le résultat final, exprimé en ammoniaque, par le rapport $\frac{60}{34} = 1,7647$, on a la quantité d'urée correspondante.

Il ne faut pas oublier que cette méthode est inapplicable aux urines sucrées.

Transformation du volume de l'azote en poids

Soit V_t le volume de l'azote mesuré à la pression H et à la température t de la cuve à eau ; le poids de cet azote est donné par :

$$p = V_t (H - F) n,$$

en appelant n le rapport $\frac{0^{gr},0012511}{760 (1 + 0,00367t)}$.

Table des valeurs de n de 10° à 30°.

Température	
10°	0,0015879
11	0,0015824
12	0,0015767

Température	
13	0,0015712
14	0,0015658
15	0,0015603
16	0,0015549
17	0,0015495
18	0,0015442
19	0,0015388
20	0,0015336
21	0,0015284
22	0,0015232
23	0,0015180
24	0,0015129
25	0,0015079
26	0,0015027
27	0,0014997
28	0,0014927
29	0,0014878
30	0,0014829

CHAPITRE XV

PROTÉIDES ET DÉRIVÉS

Généralités sur les protéides

331. — Les protéides sont, par définition, des composés d'une protéine avec un groupement prosthétique de nature variable. On peut classer les principaux d'entre eux, d'après la nature de ce groupement, en :

Glucoprotéides, lorsque le groupement prosthétique est formé par un hydrate de carbone azoté, le plus souvent la glucosamine.

Phosphoprotéides, formés par l'union d'une protéine avec un groupement phosphoré.

Métalloprotéides, composés d'une protéine et d'un complexe contenant tantôt du fer, tantôt du cuivre, du manganèse, du vanadium, etc.

Leurs propriétés sont variables d'un groupe à un autre.

Glucoprotéides

332. — Les glucoprotéides sont solubles dans l'eau et leurs solutions sont incoagulables par la chaleur. Ils

possèdent des propriétés légèrement acides et se dissolvent dans les alcalis en donnant des solutions visqueuses qui sont en général précipitées par les acides.

Chauffés pendant quelques heures avec des acides minéraux étendus, les glucoprotéides sont hydrolysés avec mise en liberté de glucosamine et le liquide réduit le réactif cupropotassique.

333. — Si on chauffe la solution d'un glucoprotéide, additionnée d'un peu de soude, pendant quelques instants, et si on l'additionne ensuite d'une solution de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde à 2 $^0/_0$ dans l'acide chlorhydrique à 10 $^0/_0$, jusqu'à ce que la réaction redevienne acide, il se produit une coloration rouge violacé, qui augmente par chauffage.

On distingue deux groupes de ces protéides : les mucines, insolubles dans l'eau, qui sont précipitées de leurs solutions naturelles ou alcalines par l'acide acétique, et les mucoïdes solubles dans l'eau, non précipitables par les acides.

Préparation de la mucine

334. — La mucine existe dans un grand nombre de glandes des voies respiratoires (trachée) et du tube digestif; on l'extrait facilement des glandes salivaires. Pour la préparer, on peut faire macérer la glande sous-maxillaire d'un bœuf, bien broyée, avec 20 parties de soude à 0,1 $^0/_0$. Agiter souvent et, après une demi-heure de contact, passer à travers une mousseline, puis filtrer sur papier Chardin.

Précipiter le liquide filtré par la quantité juste néces-

saire d'acide acétique, goutte à goutte, en agitant. Le précipité recueilli sur un filtre et lavé donne les réactions xanthoprotéique, du biuret, de Millon, glyoxylique ainsi que la réaction colorée indiquée ci-dessus (§ **333**). Il est soluble dans la soude ou l'acide chlorhydrique dilués.

Bouilli avec l'acide chlorhydrique à 6 ou 8 $^0/_0$ pendant une à deux heures, il donne un liquide qui réduit la liqueur de Fehling (chlorhydrate de glucosamine).

Préparation de l'ovomucoïde

335. — Le blanc d'œuf contient, à côté de l'albumine et de la globuline, une petite quantité d'un protéide incoagulable appartenant au groupe des glucoprotéides; c'est l'ovomucoïde, qui diffère des mucines en ce qu'il n'est pas, comme celles-ci, précipitable par les acides.

Pour le préparer, après avoir cassé deux œufs, on sépare les blancs des jaunes et on délaye ces blancs avec 4 fois leur volume d'eau. On acidule par l'acide acétique et on porte à l'ébullition, en agitant, pour coaguler les protéines. Lorsque le liquide bouillant est devenu clair, on filtre à travers un filtre à plis, et la solution d'ovomucoïde qui passe est concentrée au bain-marie, dans une capsule de porcelaine, jusqu'à moitié de son volume. On la sature alors, à chaud, de sulfate d'ammoniaque pulvérisé, qui précipite l'ovomucoïde, puis on filtre le liquide bouillant. On peut aussi précipiter la solution fortement concentrée par 4 à 5 volumes d'alcool à 96°. On vérifie que le précipité donne les réactions xanthoprotéique, du biuret, de Millon, et celle du diméthylaminobenzaldéhyde.

336. — *Caractérisation de la glucosamine.* Le précipité restant est dissous dans 25 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 10 $^0/_0$; on verse la solution dans un ballon muni d'un long tube qui sert de réfrigérant et on fait bouillir doucement pendant 3 heures. Le liquide est devenu réducteur. On neutralise, on filtre, et sur 5 centimètres cubes on détermine approximativement le pouvoir réducteur, que l'on exprime en glucose.

On ajoute alors, pour chaque gramme de sucre calculé, 10 centimètres cubes de chlorure de benzoyle et 100 centimètres cubes de soude à 10 $^0/_0$; on agite vigoureusement, et on voit se former un précipité blanc de benzoyl-glucosamine que l'on peut recueillir sur un filtre, laver et sécher.

Phosphoprotéides

337. — Les phosphoprotéides doivent à la présence d'un groupement phosphoré leurs propriétés acides. Ils sont solubles dans les alcalis dilués et reprécipités de leurs solutions par les acides étendus.

On les divise en deux groupes : les para ou pseudo-nucléoprotéides, qui ne contiennent pas dans leur molécule de bases puriques liées à l'acide phosphorique, et les nucléoprotéides vrais, dédoublables avec formation d'un acide nucléique.

338. — Le premier groupe comprend surtout la caséine du lait et la vitelline du jaune d'œuf.

Traitées par une solution de soude à 1 $^0/_0$, pendant 24 à 48 heures, à la température de 37°, ces substances

perdent la totalité de leur phosphore à l'état d'acide phosphorique (Plimmer et Scott).

Préparation de la caséine du lait

339. — Mesurer dans un verre à pied 50 centimètres cubes de lait et diluer avec 150 centimètres cubes d'eau. Ajouter goutte à goutte, en remuant, de l'acide acétique à 1 $^0/_0$, tant qu'il se fait un précipité, en évitant un excès. Pour 1 litre de lait, il faut environ $0^{gr},75$ à 1 gramme d'acide acétique $C^2H^4O^2$, soit dans le cas présent de 3 à 5 centimètres cubes d'acide au 1/100. Laisser reposer, filtrer. Détacher le précipité du filtre, le triturer avec quelques gouttes d'ammoniaque, ajouter 20 centimètres cubes d'eau pour dissoudre. Filtrer sur un filtre mouillé, à plusieurs reprises, s'il est nécessaire; précipiter cette solution, qui doit être limpide ou à peine opalescente, avec de l'acide acétique à 1 $^0/_0$, tant qu'il se forme un précipité. On a ainsi de la caséine à peu près pure que l'on peut recueillir sur un filtre, déshydrater par lavages à l'alcool et à l'éther, puis sécher.

Préparation de l'ovovitelline

340. — On part du jaune d'œuf frais, que l'on débarrasse aussi bien que possible des petites quantités de blanc restées adhérentes. On prend deux jaunes et on les mélange par agitation avec un volume égal de solution de sel marin à 10 $^0/_0$. La masse versée dans un flacon est additionnée de 50 centimètres cubes

d'éther, et secouée énergiquement, puis abandonnée au repos pendant 24 heures.

L'éther est décanté et remplacé par une nouvelle quantité ; on agite et on laisse encore en contact; on recommence une troisième fois l'épuisement.

La solution dans l'eau salée est diluée avec 20 fois son volume d'eau et le précipité, bien rassemblé, est lavé plusieurs fois par décantation.

L'ovovitelline impure peut être redissoute dans la solution de chlorure de sodium à 10 °/₀, épuisée encore une fois à l'éther, et de nouveau précipitée par addition d'un excès d'eau. On termine comme au § **339**.

Nucléoprotéides

341. — Ces protéides sont des corps à fonction acide, caractérisés par la présence d'un acide nucléique dans lequel le phosphore, à l'état d'acide phosphorique, est combiné à des bases puriques et pyrimidiques et à un groupement hydrocarboné de nature pentosique. Les nucléoprotéides sont solubles dans l'eau, en milieu légèrement alcalin, et dans les solutions salines étendues. Ils sont précipités de leurs solutions par les acides étendus, mais solubles dans un excès de réactif.

342. — La plupart des nucléoprotéides sont incoagulables par la chaleur et peuvent être extraits des organes broyés par épuisement à l'eau bouillante. On utilise aussi pour leur extraction des solutions alcalines très diluées (ammoniaque à 0,1-0,2 °/₀, carbonate ou bicarbonate de sodium à 0,25-0,50 °/₀), dont on les précipite par l'acide acétique.

343. — Les nucléoprotéides donnent par hydrolyse la série suivante de produits de dédoublement :

nucléoprotéide
protéine — nucléine
protéine — acide nucléique { acide phosphorique, groupement sucré, bases puriques, — pyrimidiques.

La richesse en phosphore croît successivement de 1-3 % pour les nucléoprotéides à 4-7 % dans les nucléines et à 9-10 % dans les acides nucléiques.

Extraction de la ferratine du foie

344. — Le foie renferme un nucléoprotéide qui contient du fer, comme d'ailleurs la plupart des corps de ce groupe, mais en quantité plus notable.

Pour extraire cette substance, on divise finement, au hache-viande, 50 grammes de foie de porc et on les délaie dans 200 centimètres cubes d'eau, puis on fait bouillir pendant 5 minutes et on filtre. Le liquide opalescent est acidulé au moyen d'acide tartrique, en solution à 10 ou 15 %, tant qu'il se fait un précipité. On recueille ce dernier sur filtre ou par centrifugation et on le lave avec un peu d'eau. Il constitue la ferratine. On vérifiera que ce corps, dissous dans quelques gouttes d'ammoniaque étendue et additionné de sulfure d'ammonium, ne donne aucun précipité. Si on l'incinère, il laisse une petite quantité de cendres qui donnent très facilement la réaction du fer (§ **23**). Ce métal se trouve donc en combinaison organique.

Les cendres sont également riches en acide phosphorique, qu'on décèlera suivant le § **14**.

Préparation de l'acide nucléique de la levure

345. — Pour préparer l'acide nucléique de la levure, on peut opérer de la manière suivante :

On place dans un verre à pied 40 grammes environ de levure pressée du commerce et on y ajoute 30 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B. On délaie bien la levure et on laisse la masse en contact pendant un quart d'heure. Après ce temps, on ajoute 20 centimètres cubes d'eau, puis on agite vivement et on verse en même temps 10 à 20 centimètres cubes d'une solution de chlorure ferrique à 10 $^0/_0$, qui produit un précipité gélatineux. La masse, qui doit être à peu près homogène, est égouttée sur une toile, que l'on place au-dessus d'un entonnoir, de manière à recueillir le liquide presque clair dans un matras. Le résidu resté sur la toile est délayé dans 50 centimètres cubes d'eau chauffée à 60-70°, puis égoutté à nouveau sur la toile.

Le liquide filtré, coloré en brun, est versé dans un égal volume d'alcool à 85°, contenant assez d'acide chlorhydrique pour que le mélange reste faiblement acide. Le précipité d'acide nucléique est recueilli sur un filtre, lavé avec un peu d'alcool à 85°, puis redissous dans la quantité juste nécessaire de soude à 10 $^0/_0$. On précipite à nouveau en versant la solution alcaline dans l'alcool acide, et on recueille finalement sur un filtre.

346. — Une partie du précipité d'acide nucléique, introduite dans un tube à essai avec quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré et une pincée de phloroglucine donne, par chauffage, une

coloration rouge intense, due à la présence d'un groupement sucré (pentose).

347. — On recherchera l'acide phosphorique sur une autre portion, que l'on hydrolyse dans un tube à essai, en faisant bouillir pendant cinq minutes avec quelques centimètres cubes d'acide nitrique étendu de son volume d'eau. On utilisera ensuite le molybdate d'ammonium, suivant les indications du § **13**.

Hydrolyse de l'acide nucléique et séparation des produits d'hydrolyse

348. — On peut hydrolyser facilement les acides nucléiques au moyen des acides concentrés, à une douce température ; on obtient une solution peu colorée d'où il est facile d'extraire les produits de dédoublement.

On prend 5 grammes d'acide nucléique du commerce[1] que l'on délaie dans 10 centimètres cubes d'acide nitrique de densité 1,2 (soit 6 centimètres cubes d'acide à 36° B. et 4 centimètres cubes d'eau) de façon à avoir une bouillie homogène. On abandonne à une température de 25-30°, en agitant de temps à autre. Il y a dégagement de gaz et la masse devient fluide et transparente. Après vingt-quatre heures, l'hydrolyse est terminée.

349. — *Séparation des bases puriques.* On procède

---

[1] Cet acide est habituellement retiré de la levure de bière.

alors à la séparation des bases puriques. Pour cela, le liquide étendu de 10 centimètres cubes d'eau est additionné avec précaution d'ammoniaque concentrée, d'abord jusqu'à neutralisation, puis en grand excès. Il se fait un précipité blanc de guanine que l'on essore à la trompe et qui peut être purifiée par dissolution dans l'acide chlorhydrique à 10 $^0/_0$, à chaud, et reprécipitation par l'ammoniaque.

350. — Le liquide filtré, renfermant les autres bases, est débarrassé de la plus grande partie de l'ammoniaque par entraînement au moyen d'un courant d'air que l'on y fait barboter, puis neutralisé exactement avec l'acide nitrique à 10 $^0/_0$. On y ajoute alors une solution saturée de picrate de sodium tant qu'il se fait un précipité, formé de picrate d'adénine. Ce sel, essoré à la trompe et lavé à l'eau, peut être purifié par cristallisation dans l'eau bouillante.

351. — La solution résiduelle, acidulée par l'acide nitrique, est épuisée à l'éther tant que celui-ci se colore en jaune, pour enlever l'acide picrique en excès. On lui ajoute ensuite un léger excès d'ammoniaque, et du nitrate d'argent, en solution à 10 $^0/_0$, tant qu'il se fait un précipité. On entraîne ainsi, à l'état de combinaisons argentiques, la xanthine et l'hypoxanthine. Le précipité est essoré à la trompe, lavé avec un peu d'ammoniaque diluée, et essoré complètement. On le détache alors et on le chauffe dans un petit ballon avec 20 centimètres cubes d'acide nitrique et 20 centimètres cubes d'eau, en ajoutant quelques décigrammes d'urée (qui a pour but de détruire l'acide nitreux). Lorsque

l'ébullition commence, on retire du feu et on laisse refroidir. La solution, filtrée sur un petit tampon d'amiante, renferme le nitrate de xanthine argentique, qui se dissout dans l'acide nitrique chaud ; le précipité contient l'hypoxanthine.

On peut séparer les deux bases de leurs combinaisons argentiques en les décomposant par l'acide chlorhydrique étendu, filtrant et faisant cristalliser les chlorhydrates.

Réactions générales des composés puriques

352. — Les bases puriques (adénine, guanine, hypoxanthine et xanthine), l'acide urique, etc., sont précipités à l'état de combinaisons cuivreuses par le sulfate de cuivre, en présence de bisulfite de sodium.

Il suffit d'ajouter à 10 centimètres cubes du liquide dans lequel on veut les rechercher, rendu légèrement alcalin par le carbonate de sodium, quelques centimètres cubes de solution commerciale de bisulfite de sodium, puis, goutte à goutte, en agitant, une solution de sulfate de cuivre. La précipitation se produit plus facilement si on chauffe le mélange à l'ébullition.

Les combinaisons cuivreuses, qui sont blanches quand elles sont parfaitement pures, sont le plus souvent colorées légèrement en brun, lorsqu'elles se produisent dans des mélanges complexes. Elles forment des précipités gélatineux qui obstruent rapidement les filtres.

353. — Les bases puriques et l'acide urique sont

précipités par le nitrate d'argent, en solution nettement alcalinisée par l'ammoniaque.

Les précipités blancs sont des combinaisons argentiques, insolubles dans l'eau ammoniacale, que l'on utilise fréquemment pour la séparation de ces bases.

On ajoute à 10 centimètres cubes du liquide dans lequel on fait la recherche une quantité d'ammoniaque suffisante pour rendre la réaction nettement alcaline, puis, goutte à goutte, une solution de nitrate d'argent à 10 $^0/_0$, tant qu'il se fait un précipité blanc.

Recherche de l'acide urique et de la caféine (réaction de la murexide)

354. — Cette réaction est fournie par certains dérivés de la purine, tels que l'acide urique ou la caféine.

On place dans une capsule de 3 centimètres de diamètre une très petite quantité (quelques milligrammes) de la substance à essayer, on mouille avec une goutte d'acide nitrique fumant (à 40° B.) et on évapore l'excès d'acide au bain-marie. On termine l'évaporation à sec sur une petite flamme. Si le résidu *bien sec* n'est pas coloré en rose vif ou en orangé, recommencer le traitement à l'acide nitrique. Refroidir, mouiller avec une gouttelette d'ammoniaque diluée : la tache se dissout en violet pourpre ; une goutte de soude la dissout également en donnant une solution bleue.

355. — On peut aussi oxyder la substance au moyen d'une paillette de chlorate de potassium et d'une goutte d'acide chlorhydrique. On évapore à sec et on traite

par l'ammoniaque après refroidissement. Sous cette dernière forme, la réaction est donnée seulement par l'acide urique, la caféine et la xanthine.

Réaction de la guanine et de la xanthine

356. — Lorsque l'on chauffe avec précaution une parcelle de guanine ou de xanthine avec une goutte d'acide nitrique fumant, on obtient par évaporation de l'acide en excès une teinte jaune citron ; cette tache se dissout en orangé dans une goutte de lessive de soude. Si on évapore à nouveau la solution dans la soude, on voit la teinte devenir de plus en plus rouge et même violacée. Cette réaction se distingue facilement de celle que donne l'acide urique dans les mêmes conditions.

L'adénine et l'hypoxanthine ne donnent pas de coloration lorsqu'on les traite de la même manière.

Dosage de la caséine dans le lait

357. — On opère sur 10 grammes de lait qui sont traités par un mélange d'alcool et d'éther, comme il est dit au § **213**, afin d'en extraire la matière grasse.

La solution contenant la caséine est aussitôt précipitée par addition d'acide acétique à 5 $^0/_0$, ajouté goutte à goutte, en remuant sans cesse. Il en faut un volume égal à celui de la solution de soude à 1,5 $^0/_0$ employée au début pour dissoudre la caséine. Lorsque la précipitation est totale, on centrifuge, on décante le liquide surnageant, et on délaie le précipité dans 20 à 30 centi-

mètres cubes d'eau ; on centrifuge de nouveau et on recommence ce lavage encore une fois.

Les liquides décantés sont passés à travers un filtre taré ; on délaie finalement la caséine dans 50 à 60 centimètres cubes d'alcool à 96°, on la jette sur le filtre, et on la lave, d'abord avec un peu d'alcool, puis avec 20 à 25 centimètres cubes d'éther.

Le filtre et son contenu sont enfin séchés à l'étuve à 105° jusqu'à poids constant.

On peut ensuite calciner, peser les cendres résiduelles et déduire leur poids de celui de la caséine.

Quand on opère sur du lait bouilli, on pèse à la fois l'albumine coagulée et la caséine.

Dosage de l'acide urique et des bases puriques dans l'urine

358. — L'urine humaine renferme de $0^{gr},3$ à $0^{gr},8$ de corps puriques par litre ; les trois quarts sont formés par de l'acide urique et le reste par des bases, xanthine, hypoxanthine, etc. Lorsque la proportion d'acide urique est assez élevée, une partie de ce corps se dépose par refroidissement de l'urine à l'état cristallisé ; sa forme est alors très caractéristique (*fig.* 33).

On peut doser rapidement et avec une exactitude suffisante l'acide urique et les bases puriques en bloc en précipitant ces composés à l'état de combinaisons argento-magnésiennes, au moyen d'un volume connu de solution argentique employée en excès ; on détermine ensuite la quantité d'argent restée en solution (Procédé Haycraft modifié par Denigès).

359. — On commence par préparer une solution argento-magnésienne de la manière suivante : on fait dissoudre 75 grammes de chlorure d'ammonium et 50 grammes de chlorure de magnésium dans 400 centimètres cubes d'ammoniaque à 22° B., en chauffant

Fig. 33. — Acide urique.

très légèrement; on ajoute de l'ammoniaque de manière à amener le volume à 510 centimètres cubes environ, on mélange, puis on filtre la solution dans une fiole jaugée de 1 litre contenant 500 centimètres cubes exactement mesurés d'une solution décime de nitrate d'argent (voir § **63**).

Lorsque la fiole est remplie jusqu'au trait de jauge, on mélange bien son contenu et on a ainsi 1 litre de solution N/20 d'argent.

360. — Dans un verre à pied de 250 centimètres cubes, on verse 25 centimètres cubes exactement me-

surés de la liqueur argento-magnésienne, puis on y fait couler, en agitant, 100 centimètres cubes d'urine. On agite encore pendant quelques instants, puis on filtre (à travers un filtre à plis) dans une fiole jaugée de 100 centimètres cubes. On prélève ainsi 100 centimètres cubes de liquide filtré correspondant à 80 centimètres cubes d'urine et on y dose l'argent. Pour cela, on les verse dans un verre à pied, on ajoute 10 centimètres cubes de solution N/10 de cyanure de potassium [1], 1 centimètre cube de solution d'iodure de potassium à 10 $^0/_0$ récemment préparée, et on fait couler une solution décinormale de nitrate d'argent, contenue dans une burette, en agitant sans cesse jusqu'à ce qu'il se forme un léger précipité persistant.

Les 10 centimètres cubes de cyanure de potassium N/10 correspondant exactement à la quantité d'argent introduite au début de l'opération, il en résulte que le volume de nitrate d'argent ajouté correspond à la

---

[1] Pour préparer la solution décime de cyanure de potassium, on dissout 16 à 18 grammes de cyanure pur du commerce dans 1.100 centimètres cubes d'eau, on ajoute 10 centimètres cubes de lessive de soude à 36° B., on mélange et on filtre s'il est nécessaire. Pour le titrage, on mesure 10 centimètres cubes de liquide que l'on verse dans un verre avec un égal volume d'ammoniaque à 22° B., 50 centimètres cubes d'eau et 1 centimètre cube d'iodure de potassium à 10 $^0/_0$. On agite et on fait couler la solution de nitrate d'argent N/10 jusqu'à trouble persistant.

Soit n le volume de solution argentique employé ; pour que la solution de cyanure soit décime, c'est-à-dire corresponde exactement à celle d'argent, il faut ajouter à 1 litre de solution de cyanure un volume d'eau égal à :

$$(n - 10) \times 100.$$

Cette solution se conserve assez bien ; il est prudent de vérifier son titre tous les quinze jours environ.

quantité d'argent utilisée pour précipiter les corps puriques. Chaque centimètre cube de solution décime d'argent correspondant à $0^{gr},0168$ d'acide urique, la quantité totale de corps purique (exprimée en acide urique) est donnée, en grammes par litre, par :

$$n \times 0,0168 \times \frac{1.000}{80} = n \times 0,21,$$

n étant le volume de nitrate d'argent N/10 utilisé.

361. — Pour doser seulement l'acide urique dans l'urine, on peut employer la technique suivante. On précipite l'acide urique à l'état d'urate d'ammonium ; ce sel, redissous en milieu alcalinisé par du borate de sodium et du bicarbonate de potassium, est titré au moyen d'une solution décinormale d'iode (Ronchèse).

A 100 centimètres cubes d'urine, on ajoute 15 centimètres cubes d'ammoniaque à 22° B. et 15 grammes de chlorure d'ammonium ; on laisse en contact une demi-heure, puis on filtre, et le précipité (recueilli sur un filtre sans plis) est lavé avec 30 centimètres cubes d'une solution contenant, pour 1 litre, 150 centimètres cubes d'ammoniaque et 150 grammes de chlorure d'ammonium.

Le filtre bien égoutté est retiré de l'entonnoir, déplié avec précaution, puis son contenu est détaché complètement au moyen d'un jet de pissette (en opérant au-dessus d'un verre à pied) et la suspension introduite dans un ballon de 500 centimètres cubes. On ajoute goutte à goutte de l'acide acétique à 10 %, jusqu'à redissolution du précipité, puis assez d'eau

pour amener le volume à 300 centimètres cubes environ ; on alcalinise alors par addition de 20 centimètres cubes d'une solution saturée à la fois de borate de sodium et de bicarbonate de potassium et on verse une solution décinormale d'iode [1], jusqu'à coloration nettement jaune de tout le liquide, persistant pendant une minute. Le virage ne présente pas une très grande netteté. Chaque centimètre cube d'iode décinormal correspond à $0^{gr},0084$ d'acide urique. Comme il reste en solution, lors de la précipitation de l'urate d'ammonium, une quantité de ce sel correspondant à $0^{gr},001$ d'acide urique, on voit que la teneur de l'urine en acide urique est donnée, en grammes par litre, par la formule :

$$[(n \times 0,0084) + 0,001] \times 10$$

dans laquelle n est le nombre de centimètres cubes de solution d'iode employés.

Dosage de la caféine

362. — La caféine est un dérivé purique (triméthylpurine) qui existe en proportion variable (1 à 3 %) dans le café, le thé, le maté.

Pour la doser, on fait bouillir 10 grammes de produit réduit en poudre fine avec 100 centimètres cubes

---

(1) La solution décinormale d'iode est préparée en triturant dans un mortier $12^{gr},7$ d'iode pur et sec avec 25 à 30 grammes d'iodure de potassium et 10 centimètres cubes d'eau, puis amenant au volume de 1 litre avec de l'eau distillée.

d'eau. Après dix minutes, on décante le liquide dans une fiole jaugée de 500 centimètres cubes, et on fait encore quatre extractions de la même manière. On ajoute au liquide du sous-acétate de plomb en très léger excès, pour précipiter les matières étrangères, on complète au trait de jauge avec de l'eau, on mélange et on filtre. On recueille 400 centimètres cubes de liquide, auxquels on ajoute de l'acide sulfurique, goutte à goutte, pour précipiter le plomb; on filtre, on lave le précipité trois à quatre fois, et on concentre le liquide avec les eaux de lavage, de préférence dans le vide, jusqu'au volume de 30 à 40 centimètres cubes. On filtre dans une boule à décanter, on lave le ballon et le filtre, et on épuise le liquide par agitation avec 40 à 50 centimètres cubes de chloroforme. On décante le dissolvant dans un ballon, après l'avoir filtré, et on recommence l'épuisement trois à quatre fois, avec le même volume de chloroforme.

Les solutions chloroformiques sont distillées; le résidu est transvasé dans un vase à extrait et évaporé sur le bain-marie. La caféine cristallise; on la sèche jusqu'à poids constant et on pèse. Le poids multiplié par 12,5 donne la caféine rapportée à 100 grammes de produit.

CHAPITRE XVI

PIGMENTS

Hémoglobine

363. — La matière colorante rouge du sang des vertébrés ou hémoglobine est un protéide ferrugineux, qui se dédouble aisément en une protéine, la globine, et en un groupement prosthétique, l'hématine, contenant la totalité du fer. Pour obtenir ce dédoublement, il suffit de dissoudre quelques gouttes de sang dans 5 centimètres cubes d'eau et d'ajouter un peu d'acide chlorhydrique ; l'hématine se précipite en flocons bruns.

L'hémoglobine et mieux encore sa combinaison oxygénée peuvent, dans certains cas, être obtenues à l'état de cristaux; la forme de ceux-ci diffère suivant l'espèce animale dont ils proviennent.

Cristallisation de l'oxyhémoglobine

364. — Pour obtenir rapidement des cristaux d'oxyhémoglobine, on emploie de préférence le sang de

cobaye ou de rat. Le premier donne des cristaux en

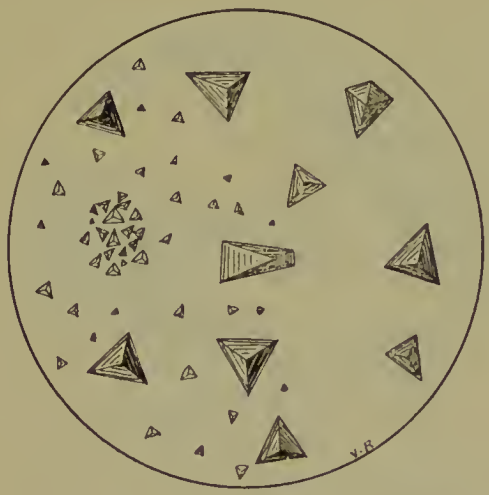


Fig. 34. — Oxyhémoglobine de cobaye.

forme de tétraèdres (*fig.* 34) ; le second des cristaux

Fig. 35. — Oxyhémoglobine de rat.

prismatiques très fins réunis en rosaces (*fig.* 35). On

peut aussi utiliser le sang de cheval, qui fournit des

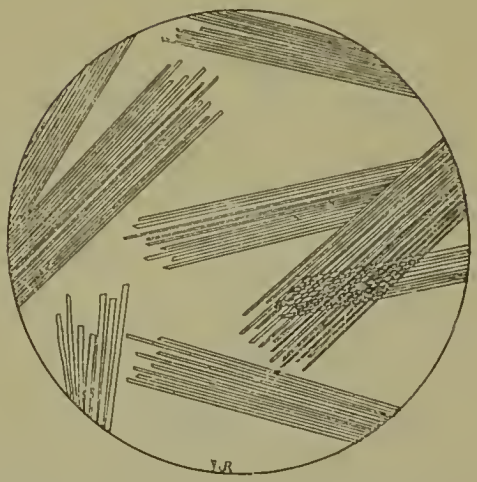


Fig. 36. — Oxyhémoglobine de cheval.

prismes très allongés (*fig.* 36), ou le sang d'écureuil,

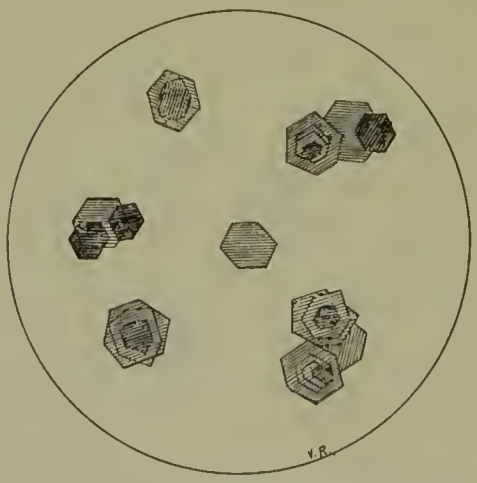


Fig. 37. — Oxyhémoglobine d'écureuil.

qui donne des lames hexagonales régulières (*fig.* 37).

Après avoir recueilli le sang de l'animal dans un petit flacon contenant des perles de verre, on agite vivement pendant une dizaine de minutes, de manière à favoriser la formation de la fibrine. Celle-ci reste adhérente aux perles; on décante, on ajoute pour chaque centimètre cube de sang défibriné 7 à 8 gouttes d'éther saturé d'eau, on agite de façon à saturer le liquide et à provoquer l'hémolyse, c'est-à-dire la dissolution de l'hémoglobine, on bouche et on abandonne à basse température, par exemple à la glacière. Les cristaux se déposent après un temps variable, de quelques minutes à quelques jours.

365. — Si on veut seulement examiner au microscope la forme cristalline de l'oxyhémoglobine, on mélange sur une lame de verre une goutte de sang défibriné avec une goutte d'eau ; on abandonne un instant à la dessiccation, jusqu'à ce que les bords de la goutte commencent à se dessécher, puis on couvre avec une lamelle. Les cristaux apparaissent dans l'intérieur de la préparation, à partir de l'anneau produit par la dessiccation.

Préparation de l'oxyhémoglobine

366. — Lorsque l'on veut préparer une quantité importante d'oxyhémoglobine cristallisée, on s'adresse de préférence au sang de cheval. On centrifuge le sang soit immédiatement après la saignée, soit après l'avoir rendu incoagulable par addition de 1 gramme d'oxalate de sodium pulvérisé par litre. Après décantation du plasma, les globules sont délayés dans l'eau

salée à 8 grammes de chlorure de sodium par litre ; on centrifuge à nouveau, on décante le liquide surnageant, et on recommence le lavage encore deux fois.

Les globules lavés sont maintenant délayés dans 2 à 3 volumes d'eau tiède (chauffée à 40° au plus) ; l'hémolyse se produit aussitôt, et les stromas peuvent être séparés par centrifugation. Le liquide rouge foncé limpide est placé dans une éprouvette de verre que l'on refroidit à 0° dans la glace pilée additionnée d'un peu de sel. Lorsque le refroidissement est complet, on ajoute au liquide, en remuant vivement, 1/4 de son volume d'alcool également refroidi à 0° et on l'abandonne dans le mélange réfrigérant. La cristallisation commence presque aussitôt. Après douze heures, on essore les cristaux à la trompe et on les lave avec un peu d'alcool à 25° refroidi à 0°, puis on les fait sécher à basse température dans le vide, sur l'acide sulfurique.

Recherche du sang par la formation des cristaux de chlorhydrate d'hématine (cristaux de Teichmann).

367. — Déposer sur une lame de verre bien propre une petite goutte de sang défibriné et autant d'une solution de chlorure de sodium à 0,1 °/₀ ; mélanger, puis laisser sécher à la température ordinaire (en tout cas, à une température inférieure à 40°), pour éviter la coagulation des substances protéiques qui, sans cela, gêneraient la réaction. Déposer sur la tache une grosse goutte d'acide acétique cristallisable, mettre une lamelle et chauffer lentement sur une très petite

flamme (on doit atteindre tout au plus le point d'ébullition de l'acide). Si, pendant ce chauffage, on observe avec soin la préparation, on voit tout à coup la tache rouge se dissoudre et faire place à une coloration violacée ou bleuâtre. A ce moment la transformation est accomplie et on peut observer au microscope (*fig.* 38) (obj. 5

Fig. 38. — Cristaux de Teichmann. A droite, faible grossissement; à gauche, fort grossissement.

ou 8. ocul. 2). En outre du point où ils se sont produits, on voit souvent apparaître des cristaux dans le reste de la préparation, en particulier sur les bords de la lamelle pendant le refroidissement.

Caractères spectroscopiques de l'hémoglobine

368. — Lorsque l'on examine au spectroscope, sous une épaisseur de 1 à 2 centimètres, une solution assez diluée (0,2 à 0,3 $^0/_0$) d'oxyhémoglobine, on voit une absorption de l'extrémité violette du spectre, et on

constate en outre l'existence de deux bandes d'absorption comprises à peu près entre les raies D et E. Celle qui est au voisinage de la raie D est moins large que l'autre, mais elle paraît, en revanche, plus foncée.

Le spectroscope à vision directe étant réglé, comme il est indiqué au § **239**, la raie D coïncide avec la division 590, et la raie E avec la division 530 environ.

369. — On verse dans un tube à essai 10 centimètres cubes d'eau distillée et quelques gouttes de sang défibriné, on agite, et, dès que le liquide est redevenu transparent, on l'examine à travers la fente du spectroscope. On aperçoit les deux bandes caractéristiques de l'oxyhémoglobine, dont les axes correspondent respectivement aux longueurs d'onde 578 et 542 (*fig.* 39, I).

370. — Si on ajoute à cette solution d'oxyhémoglobine 5 à 10 gouttes d'un réducteur énergique, comme l'hydrosulfite de sodium [1], il y a transformation en hémoglobine réduite ; le liquide rose vif se colore en

---

[1] Pour préparer la solution d'hydrosulfite de sodium, on opère comme suit : On dilue 40 centimètres cubes de bisulfite de sodium à 36° B. avec 200 centimètres cubes d'eau et on ajoute 5 à 6 grammes de poudre de zinc. On refroidit et on agite vivement. Au bout d'une demi-heure de contact, on filtre, on ajoute un lait de chaux fait avec 6 grammes de chaux vive et 30 centimètres cubes d'eau, on filtre au bout de deux minutes et on verse 15 centimètres cubes d'une solution de carbonate de sodium à 10 %. Le liquide, filtré encore une fois, est conservé dans de petits flacons pleins et bien bouchés. Il garde ses propriétés réductrices pendant quelques jours, surtout si on le conserve à basse température.

Lorsque l'on n'a pas d'hydrosulfite, on peut le remplacer par une solution de sulfure d'ammonium ; la réduction ne se produit alors qu'avec lenteur, au bout de plusieurs minutes.

rouge violacé plus sombre et, si on examine au spectroscope, on voit les deux bandes d'absorption se rapprocher l'une de l'autre pour n'en former qu'une seule occupant à peu près l'espace libre entre les deux bandes primitives. C'est ce que l'on appelle la bande de Stokes, dont l'axe correspond sensiblement à la longueur

Fig. 39. — I, spectre de l'oxyhémoglobine; II, spectre de l'hémoglobine réduite.

d'onde 555 (*fig.* 39, II). Pour observer le rapprochement des bandes, il est bon d'opérer avec une solution assez concentrée d'oxyhémoglobine (10 gouttes de sang au moins pour 10 centimètres cubes d'eau), la bande de Stokes étant toujours plus pâle que les bandes de l'oxyhémoglobine.

371. — Si au lieu d'un réducteur on ajoute à la solution un oxydant, comme le ferricyanure de potassium (quelques gouttes d'une solution à 10 $^0/_0$), il se forme de la méthémoglobine et le liquide brunit ; on voit alors apparaître, en sus des deux bandes de l'oxyhémoglobine, une troisième bande étroite, située dans le rouge, à gauche de la raie D.

Réaction des pigments biliaires

372. -- Les pigments biliaires donnent, sous l'action de l'acide nitrique contenant un peu d'acide nitreux, une série de colorations caractéristiques, se succédant dans un ordre donné : c'est la réaction dite de Gmelin. Pour l'obtenir, on verse dans un tube à essai 4 à 5 centimètres cubes d'acide nitrique concentré, à peine coloré en jaune, et on fait couler au-dessus, au moyen d'une pipette, en évitant le mélange avec l'acide, la solution des pigments biliaires. Au bout de quelques instants, on voit au contact de l'acide un anneau coloré en jaune et en rouge ; plus tard, on aperçoit une série d'anneaux superposés, colorés, de bas en haut, en rouge, violet, bleu et vert.

373. — Hammarsten a modifié cette réaction de la manière suivante : on prépare un mélange de 1 centimètre cube d'acide nitrique concentré, 19 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré et 60 centimètres cubes d'eau, et on abandonne ce mélange à la lumière pendant une semaine environ. Le liquide devient jaune clair et peut dès lors être employé. Dans ce but, on le mélange avec quatre fois son volume d'alcool à 95°, mais seulement au moment de l'emploi.

Si à 2 ou 3 centimètres cubes de ce mélange, contenu dans un tube à essai, on ajoute quelques gouttes de la solution des pigments biliaires, il se produit une belle coloration verte, qui persiste indéfiniment. En ajoutant à ce liquide vert des quantites croissantes du mélange alcool-acide, la teinte verte passe au bleu,

puis au violet, au rouge et enfin au jaune. Chacune de ces teintes, une fois produite, se conserve indéfiniment. On pourra préparer la gamme de teintes dans une série de tubes, en partant du liquide vert, préalablement obtenu et réparti ensuite dans les tubes.

Recherche des pigments biliaires dans l'urine

374. — On verse 10 centimètres cubes d'urine dans un tube à essai, on ajoute 5 centimètres cubes d'une solution de chlorure de baryum à 10 $^0/_0$ et de l'eau de baryte en quantité suffisante pour rendre le mélange alcalin, puis on agite vivement. On jette sur un filtre, et on lave le précipité avec un peu d'eau distillée. On perce alors le filtre et on fait tomber le précipité dans un tube au moyen de 5 centimètres cubes d'alcool à 90° auxquels on ajoute 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 22° B. On place le tube dans un bain-marie bouillant pendant une minute, puis on examine. Si l'urine contient des pigments biliaires, le liquide surnageant le précipité est coloré en vert plus ou moins foncé, selon la proportion de pigments. Il peut se faire que l'on obtienne une coloration brune, non caractéristique ; dans ce cas, on ajoute au contenu du tube 2 gouttes d'eau oxygénée et on porte de nouveau au bain-marie ; on voit alors apparaître la teinte verte, s'il s'agit des pigments biliaires.

On peut rendre l'essai encore plus net, si on décante avec une pipette la solution alcoolique verdâtre bien refroidie et si on la fait couler doucement, en évitant le mélange, au-dessus de 4 à 5 centimètres cubes d'acide nitrique concentré, contenus dans un tube à essai. Il

se fait aussitôt une série d'anneaux colorés en rouge, violet, bleu et vert, comme au § **372**.

Recherche de l'urobiline dans l'urine

375. — L'urobiline est un pigment dérivé des colorants de la bile, qui se trouve dans l'urine en quantité variable. Il est caractérisé par sa propriété de donner avec les solutions alcooliques des sels de zinc une fluorescence verte.

376. — On peut opérer directement avec l'urine. On met dans un tube à essai environ 1 gramme d'acétate de zinc en poudre fine, 10 centimètres cubes d'alcool à 96° et on agite de façon à saturer l'alcool. On verse alors 10 centimètres cubes de l'urine à essayer et on secoue à plusieurs reprises, puis on filtre et on laisse le liquide au repos. On essaie la fluorescence en éclairant le tube au moyen d'une source de lumière aussi intense que possible, puis on examine au spectroscope. En présence d'urobiline, le liquide prend une fluorescence verte, et il présente au spectroscope une bande d'absorption comprise entre les lignes E et F, soit entre les divisions 480 et 530 environ.

377. — On peut aussi utiliser le fait que l'urobiline n'est pas précipitée par les sels de mercure. On prend 100 centimètres cubes d'urine, que l'on défèque avec 10 centimètres cubes de solution de sulfate mercurique, comme au § **120**. Le liquide filtré est agité avec 10 centimètres cubes de chloroforme, dans une boule à décanter, et le chloroforme est filtré sur un petit filtre

sec. On le recueille dans un tube à essai et on y ajoute le double de son volume d'une solution d'acétate de zinc à 0,1 °/₀ dans l'alcool à 96°, en superposant les liquides, sans les mélanger. Il se fait à la surface de séparation, s'il y a de l'urobiline, un anneau coloré en vert; par agitation, le liquide prend une fluorescence verte.

Recherche des pigments dérivés de l'indol et du scatol dans l'urine

378. — L'urine renferme un dérivé de l'indol capable de se transformer par oxydation en un pigment bleu soluble dans le chloroforme et dans l'alcool amylique. De plus, on y trouve un dérivé du scatol, se transformant par oxydation en un pigment rouge insoluble dans le chloroforme, mais soluble dans l'alcool amylique.

Pour isoler ces deux pigments, on opère de la manière suivante :

A 20 centimètres cubes d'urine on ajoute 2 centimètres cubes d'acétate basique de plomb, pour déféquer ; on filtre et on prélève 10 centimètres cubes du liquide filtré que l'on verse dans un tube à essai. On ajoute 10 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur à 22° B., puis 2 centimètres cubes de chloroforme ; on agite et on laisse déposer. Si le chloroforme n'est pas coloré, on ajoute 2 gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes étendue au 1/10, on secoue de nouveau, et on laisse déposer. Le chloroforme est alors coloré en bleu plus ou moins foncé, suivant la quantité d'indoxyle contenue dans l'urine.

379. — On décante ce chloroforme complètement au moyen d'une pipette que l'on enfonce jusqu'au fond du tube, on verse dans celui-ci 2 centimètres cubes de chloroforme neuf, et on agite à nouveau ; enfin, on décante complètement ce chloroforme, qui est à peine coloré en bleu pâle. Le liquide restant, débarrassé du pigment indoxylique, est alors agité avec 2 centimètres cubes d'alcool amylique ; après repos, ce dernier se sépare, coloré en rouge par le pigment dérivé du scatol.

Préparation de la solution de chlorophylle

380. — On peut obtenir facilement une solution de chlorophylle en traitant des feuilles vertes, d'origine quelconque, par de l'alcool fort, pendant un temps suffisant ; la dissolution se fait plus rapidement si on opère à chaud, au bain-marie.

Pour obtenir une solution très concentrée de chlorophylle, on fait bouillir au réfrigérant à reflux de l'alcool à 96° avec des feuilles vertes (d'ortie, d'épinard, etc.) ; lorsque celles-ci sont épuisées, on décante l'alcool coloré en vert sur de nouvelles feuilles, on fait bouillir à nouveau, et ainsi de suite jusqu'à ce que la solution soit assez riche. Il est préférable d'opérer avec des feuilles desséchées, de facon à éviter une dilution trop rapide de l'alcool, qui ne dissout plus de chlorophylle lorsqu'il est trop étendu.

La solution concentrée de chlorophylle est opaque, si on l'examine sous une épaisseur de 10 à 15 centimètres ; elle est rouge par transparence sous une épaisseur moindre et d'un beau vert lorsqu'on l'examine sous une faible épaisseur.

Examen spectroscopique de la chlorophylle

381. — Une solution de chlorophylle assez concentrée, examinée au spectroscope, présente des bandes d'absorption plus ou moins intenses, de telle sorte qu'elle ne laisse passer la lumière que dans le vert

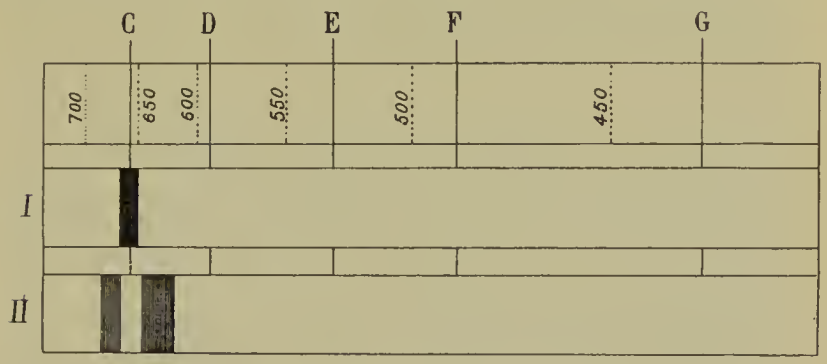


Fig. 40. — I, Bande d'absorption de la chlorophylle ; II, Dédoublement sous l'action de la potasse.

moyen et l'extrême rouge. Si on la dilue de plus en plus avec de l'alcool fort, on voit les bandes disparaître peu à peu, à l'exception d'une bande noire, très nette et très foncée, située dans le rouge et dont l'axe est voisin de la longueur d'onde 660 (*fig.* 40, I) ; cette dernière bande est encore perceptible dans des solutions très diluées de chlorophylle (jusqu'à 1/10.000).

Si on fait agir la potasse sur la solution de chlorophylle, on voit se manifester une fluorescence rouge très marquée, en même temps que la bande noire dont on vient de parler subit un dédoublement progressif ; le spectroscope montre alors deux bandes séparées par une zone rouge assez étroite (*fig.* 40, II). C'est là une

réaction très caractéristique de la chlorophylle, qui peut être utilisée pour la recherche et l'identification de cette dernière. Elle est due à M. J. Chautard, qui l'a décrite en 1874, mais sans préciser nettement les conditions dans lesquelles on doit se placer pour l'obtenir.

Nous avons déterminé ces conditions, et on pourra, en suivant exactement les indications ci-jointes, reproduire facilement le phénomène.

382. — On prépare une solution de chlorophylle d'une concentration convenable, en traitant environ $0^{gr},25$ de feuilles fraîches de gazon par 10 centimètres cubes d'alcool à 96°, dans un tube à essai. On bouche celui-ci avec un bouchon muni d'un long tube, qui sert de réfrigérant ascendant, et on chauffe à une douce ébullition, au bain-marie, pendant vingt à trente minutes. Le liquide vert, décanté dans un tube à essai, montre une bande noire intense dans le rouge.

383. — On ajoute alors une quantité de potasse correspondant à 1/1.000 (soit $0^{cm3},1$ d'une solution alcoolique de potasse à 10 $^0/_0$), et on porte à l'ébullition, que l'on maintient pendant une demi-minute. Si on examine à nouveau au spectroscope, on voit la bande noire se dédoubler peu à peu; lorsque les deux bandes, nettement séparées par une ligne rouge, ont atteint la même intensité, on peut arrêter la réaction en refroidissant rapidement le tube sous un courant d'eau. Si on laisse au contraire la réaction se continuer, on voit la bande située vers l'extrême rouge s'affaiblir, tandis que l'autre devient plus large et plus foncée; au bout de quelques

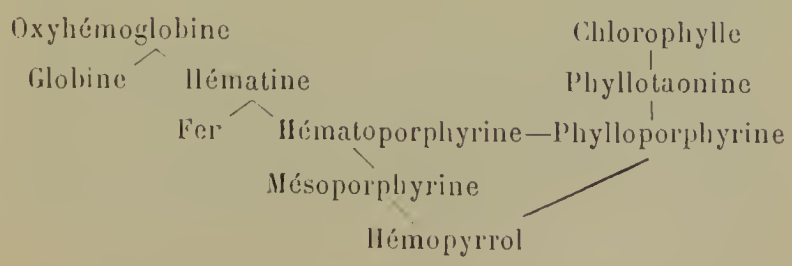
minutes, cette dernière bande seule persiste, de sorte que l'action de la potasse, à ce stade, correspond à un déplacement de la bande primitive du rouge vers le jaune.

Lorsque l'on refroidit le tube au moment où les deux bandes ont leur maximum de netteté, elles persistent beaucoup plus longtemps. Si on ajoute au liquide qui présente ces deux bandes une quantité d'acide acétique suffisante pour le rendre nettement acide, les bandes se rapprochent et se fondent en une seule, moins nette et moins foncée que la bande primitive.

Produits de dédoublement et relations de l'hémoglobine et de la chlorophylle

384. — L'hémoglobine donne, par dédoublements successifs, l'hématine, puis l'hématoporphyrine; ce dernier corps est un isomère de la bilirubine et possède les mêmes réactions.

D'autre part, l'hématoporphyrine présente une parenté manifeste avec la phylloporphyrine provenant du dédoublement de la chlorophylle; par réduction, ces deux corps donnent naissance au même produit, l'hémopyrrol, qui établit ainsi le passage entre le pigment du sang des vertébrés et celui des feuilles vertes. Ces relations sont résumées dans le tableau suivant :



Extraction du carotène des feuilles vertes

385. — Le carotène est un carbure d'hydrogène, de couleur rouge orangé, qui existe dans les feuilles vertes à côté de la chlorophylle. On le trouve aussi dans la carotte, dans un grand nombre de fruits, dans l'enduit gras de certains pollens, etc.

Pour l'extraire, on prend des feuilles d'oseille ou de marronnier, par exemple, que l'on dispose dans un exsiccateur à acide sulfurique, en quantité convenable, de manière à ce que la dessiccation puisse se faire très rapidement. On fait le vide au moyen d'une bonne trompe ou mieux d'une pompe de Carré, et on ferme le robinet. Après 24 heures, la dessiccation doit être totale. On ouvre et on retire les feuilles, qui se pulvérisent facilement lorsqu'on les froisse entre les doigts.

On introduit cette poudre grossière dans un flacon à large ouverture, avec une quantité d'éther de pétrole suffisante pour la baigner largement, on bouche et on conserve deux à trois jours à l'obscurité. L'éther de pétrole ne dissout pas la chlorophylle, mais il extrait le carotène, en même temps que des matières grasses et des cires, en se colorant en jaune. On décante le liquide jaune et on l'évapore à la température ordinaire, dans des cuvettes à photographie ou des capsules à bords verticaux.

L'extrait sec, coloré en jaune vif, peut servir à étudier les réactions du pigment. Quand on le reprend par un très petit volume d'éther de pétrole, les matières grasses se dissolvent, et le carotène reste en partie sous forme de petits cristaux à reflets mordorés.

Réactions colorées du carotène

386. — Si on verse dans l'une des capsules contenant l'extrait quelques centimètres cubes de sulfure de carbone, celui-ci dissout le résidu jaune en se colorant en rouge sang.

La solution, examinée au spectroscope dans un tube à essai, montre une absorption du spectre depuis le vert jusqu'au violet, avec deux maxima, l'un dans le vert correspondant à la longueur d'onde 517, l'autre dans le bleu correspondant à la division 486.

387. — Dans une deuxième capsule, on fait couler quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ; l'extrait se dissout en donnant tout d'abord une belle coloration bleue.

388. — Cette deuxième réaction peut être utilisée pour montrer directement la présence du carotène dans la carotte.

Si on fait une coupe mince de carotte, de préférence dans la zone corticale et si on l'examine au microscope (obj. 8, cul. 2), on aperçoit dans les cellules des cristaux aiguillés colorés en rouge orangé. On les trouve également dans une goutte du liquide obtenu en râclant un fragment de carotte. Ce sont des cristaux de phytostérine teintés par du carotène. Si on dépose sur la préparation une goutte d'acide sulfurique concentré, et qu'on examine aussitôt, après avoir recouvert avec une lamelle, on voit les cristaux prendre une couleur bleue au contact de l'acide.

389. — Lorsque l'on dispose de quantités de carotène un peu plus grandes, on peut le caractériser par la formation de son diiodure. Celui-ci précipite en flocons d'un vert foncé lorsqu'on ajoute une solution récente d'iode dans l'éther de pétrole à une solution de carotène, contenant au moins $0^{gr},01$ $^0/_0$ de celui-ci, dans le même dissolvant.

DEUXIÈME PARTIE

DYNAMIQUE

CHAPITRE XVII

HYDROLASES

Généralités sur les diastases

390. — La préparation des solutions diastasiques comporte souvent une macération plus ou moins prolongée des organes animaux ou végétaux avec de l'eau, de la glycérine, etc. Cette macération doit se faire de préférence à basse température, la masse étant fréquemment agitée. Les organes diastasifères doivent être au préalable broyés ou hachés aussi finement que possible.

Le mélange est ensuite jeté sur un filtre, les premières portions étant repassées jusqu'à ce que le liquide obtenu soit clair ; on gagnera en général beaucoup de temps en employant le papier Chardin pour la

filtration. Le liquide obtenu doit être utilisé aussitôt, ses propriétés diastasiques s'atténuant plus ou moins vite au contact de l'air, sous l'action de la lumière, etc.

391. — L'intensité des réactions diastasiques est très fortement influencée par les conditions physiques (température) et chimiques (acidité, alcalinité) de l'expérience. Il importe donc de se placer dans les conditions les plus favorables à la réaction envisagée. Pour cela la température optima, préalablement connue ou déterminée, sera maintenue constante au moyen d'un bain-marie muni d'un régulateur de température, les tubes contenant les liquides en expérience étant plongés dans l'eau de ce bain-marie et non placés dans une étuve à air chaud. La réaction optima, également connue ou déterminée, sera au début de la recherche vérifiée par un titrage en présence d'un indicateur convenable (méthylorange ou phtaléine, suivant les cas).

392. — Presque toutes les solutions diastasiques perdent complètement leur activité lorsqu'on les porte à la température de 100° pendant quelques instants. On ne devra donc jamais négliger de faire, parallèlement à l'expérience que l'on cherche à réaliser, une *expérience témoin*, dans laquelle la solution de diastase aura été préalablement chauffée pendant cinq minutes dans un bain-marie en ébullition. Seule, la différence entre les actions observées en présence de la diastase active et de la diastase chauffée peut être attribuée à l'activité diastasique.

Dans l'étude des produits de cette activité, la recherche qualitative doit être complétée autant que possible par

une évaluation quantitative de l'une au moins des substances formées.

393. — Dans les recherches dont la durée dépasse une à deux heures, on a toujours à craindre le développement des bactéries, surtout si on opère aux températures comprises entre 30° et 50°. Aussi, dans les cas où il sera impossible d'opérer aseptiquement, on devra avoir recours aux antiseptiques, choisis de telle sorte qu'ils n'entravent pas l'action de la diastase. Le fluorure de sodium, à la concentration de 1 °/₀, 2 °/₀ au plus, peut être fréquemment utilisé; le chloroforme, employé en quantité telle que le liquide en soit saturé et à condition que les tubes ou vases utilisés *soient bien bouchés*, pour éviter l'évaporation superficielle de l'antiseptique, peut aussi rendre des services. Il convient de noter à ce propos que le chloroforme réduit la liqueur de Fehling; par conséquent, lorsqu'on aura à rechercher ou à doser un sucre parmi les produits d'une réaction diastasique, effectuée en présence de chloroforme, il conviendra de chasser d'abord ce dernier par une ébullition de quelques instants.

394. — D'après les transformations qu'elles accomplissent, les diastases peuvent être classées de la manière suivante (G. Bertrand) :

1° *Hydrolases*, produisant un dédoublement avec fixation d'eau (ce sont de beaucoup les plus nombreuses);

2° *Oxydases*, fixant l'oxygène de l'air sur certains composés;

3° *Clastases*, provoquant la rupture de la molécule, sans fixation d'aucune sorte.

Préparation d'une solution de sucrase de la levure

395. — Prendre 20 grammes de levure pressée du commerce et les mélanger dans un mortier avec 10 à 15 grammes de sable fin lavé, en ajoutant peu à peu 5 centimètres cubes d'eau, puis broyer le tout pendant quatre à cinq minutes. Ajouter 40 centimètres cubes d'eau, en plusieurs fois, bien mélanger et laisser en contact pendant une demi-heure en agitant fréquemment. Filtrer de manière à ne recueillir le liquide que lorsqu'il ne passe plus de débris cellulaires ou, mieux encore, centrifuger.

Dans le cas où la levure employée contient une quantité notable de glycogène, le liquide filtré ou centrifugé est opalescent.

Influence de la réaction et de la température sur la sucrase

396. — Préparer une solution de saccharose à 20 °/₀ et en introduire 10 centimètres cubes dans six tubes à essai. Préparer d'autre part une dilution d'acide acétique à 1,5 °/₀, et faire les mélanges suivants :

Témoin 1...	1 centimètre cube sucrase bouillie + 4 centimètres cubes d'eau.
Neutre 2...	1 centimètre cube sucrase active + 4 centimètres cubes d'eau.
Acidité optima 3...	1 centimètre cube sucrase active + 1 centimètre cube acide acétique à 1,5 °/₀ + 3 centimètres cubes d'eau.

Acide 4... 1 centimètre cube sucrase active + 4 centimètres cubes acide acétique à 1,5 %.
Alcalin 5... 1 centimètre cube sucrase active + 4 centimètres cubes de soude décime.
Neutre 6... 1 centimètre cube sucrase + 4 centimètres cubes d'eau.

Le volume est ainsi de 15 centimètres cubes dans chaque tube. Ceux-ci doivent être étiquetés avec soin, afin d'éviter les erreurs. On laisse le dernier tube (n° 6) à la température ordinaire, les autres étant maintenus à la température de 56° dans un bain-marie muni d'un régulateur. Après une heure, on mesure le pouvoir réducteur de chaque tube. Pour cela, il suffit de compter le nombre de gouttes nécessaires pour décolorer exactement 2 centimètres cubes de liqueur de Fehling (voir § **111**).

On voit ainsi que ce nombre est infini pour 1 et 5, très grand pour 4, moindre pour 2 et minimum pour 3. Il est plus grand pour 6 que pour 2.

Par conséquent, la sucrase est plus active à 56° qu'à la température ordinaire ; de plus, elle est favorisée par la dose d'acide optima du tube 3 (1 p. 1.000), gênée par une acidité plus forte, entravée complètement par les alcalis.

Influence de la quantité de sucrase sur l'hydrolyse du sucre

397. — L'action de la sucrase est proportionnelle à la quantité de diastase employée, tout au moins dans les premiers moments de la réaction. Pour le vérifier, on répartit dans quatre tubes à essai 10 centimètres

cubes de solution de saccharose à 20 $^0/_0$ et on ajoute des quantités de solution diastasique proportionnelles aux nombres 1, 2, 3, 4; par exemple $0^{cm3},5$; 1^{cm3}; $1^{cm3},5$; 2^{cm3}, en complétant le volume à 12 centimètres cubes avec de l'eau. On place au bain-marie à 56°; au bout d'une demi-heure, on arrête l'action en alcalinisant légèrement par addition de quelques gouttes de lessive de soude ou de potasse et on dose le sucre interverti formé [1]. On trouve des quantités sensiblement proportionnelles aux nombres 1, 2, 3, 4, c'est-à-dire aux quantités de diastase mises en jeu.

Préparation de l'émulsine d'amandes

398. — On plonge un certain nombre d'amandes douces (10 à 12) dans 50 centimètres cubes d'eau bouillante, pendant une minute au plus. On les retire et, grâce à ce traitement, on peut les débarrasser facilement de leur enveloppe par simple pression entre le pouce et l'index. Les amandes sont alors broyées dans un mortier; lorsqu'on a obtenu une pâte fine, on dilue celle-ci avec 30 centimètres cubes d'eau, puis on ajoute 1 centimètre cube d'acide acétique à 10 $^0/_0$, qui détermine la production d'un coagulum de matières protéiques, et on filtre. Le liquide filtré, additionné d'une goutte d'acide acétique à 10 $^0/_0$, doit rester limpide. Si au contraire il se produisait un précipité, on ajouterait

---

[1] En utilisant le pouvoir réducteur ou le pouvoir rotatoire. Dans ce dernier cas, on peut arrêter l'action de la sucrase en ajoutant à chaque tube, au lieu de soude, 1 centimètre cube de solution de chlorure mercurique à 1 $^0/_0$.

goutte à goutte, en remuant, assez de réactif pour amener une précipitation totale et on filtrerait à nouveau. On obtient ainsi une solution parfaitement limpide et très active.

Action de l'émulsine sur divers glucosides

399. — On place dans une série de tubes à essai 10 centimètres cubes de solutions de divers glucosides, telles qu'un même volume de solution fournisse à l'hydrolyse une molécule de glucose, soit :

10 centimètres cubes	d'amygdaline	à 2,3 %	pour le tube	1
10 —	de salicine	à 2,8 %	—	2
10 —	d'arbutine	à 2,7 %	—	3

et on ajoute 1 centimètre cube de solution d'émulsine à chaque tube. On maintient au bain-marie à 45° pendant une demi-heure, puis on détermine le pouvoir réducteur du liquide de chaque tube en comptant le nombre de gouttes nécessaire pour décolorer 2 centimètres cubes de liqueur de Fehling.

On voit que la vitesse d'hydrolyse des divers glucosides n'est pas la même : l'amygdaline est hydrolysée le plus rapidement, puis viennent la salicine et enfin l'arbutine.

Il faut s'assurer que la solution d'émulsine ne réduit pas elle-même ; dans une recherche exacte, on doit, si l'on fait des dosages de sucre, déduire des quantités trouvées la quantité de glucose renfermée dans la solution diastasique employée.

Formation de l'essence d'amandes amères

400. — Les amandes amères contiennent à la fois de l'émulsine et de l'amygdaline, localisées dans des cellules différentes; lorsqu'on les broie, la diastase vient au contact du glucoside qui est dédoublé suivant l'équation :

$$C^{20}H^{27}NO^{11} + 2H^2O = 2C^6H^{12}O^6 + C^6H^5\text{-}CHO + CNH.$$

Il se forme de l'aldéhyde benzoïque et de l'acide cyanhydrique (essence d'amandes amères).

Pour constater cette formation d'essence, il suffit de décortiquer quelques amandes amères (après les avoir plongées pendant une minute dans l'eau bouillante), puis de les broyer au mortier en pâte fine. L'odeur de l'essence peut être perçue presque aussitôt; on pourra caractériser l'acide cyanhydrique par les réactions données ci-dessus.

Caractères de l'acide cyanhydrique

401. — On peut reconnaître l'acide cyanhydrique au moyen du papier au sulfate de cuivre et au gaïac, qui est d'une très grande sensibilité. Pour le préparer, on trempe des feuilles de papier à filtrer dans une solution de sulfate de cuivre à 1/1000, puis on fait sécher.

Au moment de l'emploi, on mouille ce papier de quelques gouttes de teinture de gaïac, fraîchement préparée; la tache se colore en bleu intense au contact de traces d'acide cyanhydrique.

L'ozone, le chlore, les vapeurs de brome ou d'iode, les vapeurs nitreuses, l'ammoniaque peuvent aussi déterminer cette réaction.

402. — *Recherche de l'acide cyanhydrique.* Pour déceler avec certitude l'acide cyanhydrique dans un liquide, on le place dans un petit ballon, après avoir acidulé avec un cristal d'acide tartrique (éviter la présence des acides minéraux libres) et on distille. On recueille les premières gouttes qui passent ou, si le liquide est très pauvre, les premiers centimètres cubes. Dans le liquide, alcalinisé par quelques gouttes de soude à 10 $^0/_0$, on recherche l'acide cyanhydrique comme il est indiqué aux § **7** et **8**.

Dosage de l'acide cyanhydrique

403. — Pour doser l'acide cyanhydrique renfermé dans un mélange complexe, on le sépare d'abord par entraînement au moyen d'un courant de vapeur, puis on titre l'acide dans le liquide distillé au moyen du nitrate d'argent.

Soit par exemple à doser l'acide formé par broyage des amandes amères. On opère sur une quantité de matière correspondant à 15 grammes d'amandes décortiquées, que l'on introduit, après broyage, dans un ballon de 250 centimètres cubes; on ajoute l'eau de lavage du mortier (50 centimètres cubes employés en deux fois), et on abandonne le ballon, bien bouché, pendant vingt-quatre heures. La réaction, très rapide dans les premières heures, n'est à peu près totale en effet qu'au bout de ce temps.

On adapte alors au ballon un bouchon à deux trous ; dans l'un passe un tube coudé que l'on met en relation avec un réfrigérant, dans l'autre un tube plongeant jusqu'au fond, par lequel on fait arriver un courant de vapeur provenant d'un gros ballon, de 1 à 2 litres, qui sert de générateur de vapeur. Il est nécessaire de chauffer légèrement le ballon contenant le lait d'amandes, pour éviter une trop forte condensation de vapeur. Au début, le liquide mousse abondamment ; il faut avoir soin de réunir le générateur au ballon à distillation par un tube de caoutchouc assez long ($0^m,20$ environ) et pas trop serré, de manière à pouvoir le détacher facilement et interrompre instantanément le courant de vapeur dès que la mousse menace de passer dans le réfrigérant. Lorsque les substances protéiques sont coagulées, la distillation se fait régulièrement.

Le liquide condensé dans le réfrigérant arrive, par un tube à entonnoir coudé, au fond d'un verre contenant 10 centimètres cubes d'ammoniaque, 10 centimètres cubes d'eau et 1 centimètre cube d'une solution d'iodure de potassium à 10 %, auxquels on ajoute 10 à 15 gouttes de lessive de soude concentrée du commerce [1]. Dès le commencement de la distillation, on verse, au moyen d'une burette, en agitant constamment, une solution décinormale de nitrate d'argent, jusqu'à

---

[1] Le liquide distillé contenant de l'aldéhyde benzoïque, on est obligé d'ajouter de la soude pour retarder l'apparition d'un trouble d'hydrobenzamide qui se produirait en présence de l'ammoniaque et masquerait la formation de l'iodure d'argent. Il est inutile d'ajouter de la soude lorsqu'on dose une solution aqueuse pure d'acide cyanhydrique.

ce qu'il se produise un léger trouble. Celui-ci se redissout dans le liquide qui continue à distiller ; on ajoute du nitrate d'argent tant que le trouble se dissout et on s'arrête lorsqu'il y a formation d'une légère opalescence persistant quelques minutes. On peut alors interrompre la distillation, car à ce moment il ne passe plus d'acide cyanhydrique.

Ce dernier donne, en présence de l'ammoniaque et du sel d'argent, un cyanure double d'argent et d'ammonium qui est soluble et se forme même en présence d'iodure de potassium. Lorsque tout l'acide cyanhydrique est ainsi combiné, si on continue à verser la solution décime de nitrate d'argent, il se produit aussitôt de l'iodure d'argent insoluble qui trouble le liquide et marque la fin de l'opération. A ce moment, chaque molécule de nitrate d'argent ajoutée a donné une molécule du sel double :

$$AgCN + NH^4CN,$$

ce qui revient à dire qu'une molécule de nitrate d'argent correspond à 2 molécules d'acide cyanhydrique. Chaque centimètre cube de nitrate d'argent décime correspond donc à $0^{gr},0054$ de cet acide, et il suffit de multiplier ce coefficient par le volume de solution argentique employé pour avoir la quantité d'acide cyanhydrique cherchée (Denigès).

404. — Lorsque l'on étudie le dédoublement diastasique de l'amygdaline, il est facile de trouver, par un dosage d'acide cyanhydrique, la quantité de glucoside hydrolysée. Il suffit de se rappeler que l'amygdaline

cristallisée $C^{20}H^{27}NO^{11} + 3H^2O$ donne, par hydrolyse complète, 5,28 % d'acide cyanhydrique.

Recherche des glucosides cyanhydriques dans les feuilles

405. — L'action des anesthésiques (chloroforme, éther) sur les feuilles contenant à la fois des glucosides cyanhydriques et des diastases capables de les dédoubler produit un dégagement d'acide cyanhydrique.

Pour le montrer, on place dans deux tubes à essai deux feuilles (ou deux fragments de feuille) de laurier-cerise, par exemple, et on remplit ces tubes aux deux tiers avec un mélange de 10 centimètres cubes de solution saturée d'acide picrique et 10 centimètres cubes de carbonate de sodium à 1 %, de façon que les feuilles soient totalement immergées. On verse dans l'un des tubes 10 à 15 gouttes de chloroforme, puis on bouche les deux tubes et on les plonge dans un bain-marie chauffé à 35-40°.

Au bout de quelques minutes, le liquide contenu dans le tube additionné de chloroforme rougit peu à peu, l'autre restant inaltéré. Cette coloration est due à la formation d'acide picramique, par suite de la réduction de l'acide picrique par l'acide cyanhydrique.

Cette réaction peut être appliquée à la recherche des glucosides cyanhydriques dans les feuilles.

Localisation de la diastase et du glucoside dans certaines graines

406. — Lorsqu'on fait agir la myrosine sur le my-

ronate de potassium, il y a dédoublement suivant l'équation :

$$C^{10}H^{16}NS^2O^9K + H^2O = C^6H^{12}O^6 + CS{=}N\text{-}C^3H^5 + SO^4KH.$$

L'isosulfocyanate d'allyle ou essence de moutarde se manifeste aussitôt par son odeur.

Cette réaction permet de montrer dans certains cas la localisation de la diastase et du glucoside dans les diverses parties d'un végétal. Ainsi les graines de *Lunaria biennis* contiennent de la myrosine dans les téguments et du myronate de potassium dans les cotylédons (Guignard).

Pour le montrer, on fait gonfler les graines de lunaire en les laissant vingt-quatre heures dans du coton hydrophile mouillé, à l'étuve à 30°. On les décortique alors une à une, et on triture séparément, dans deux mortiers, les téguments et les cotylédons. Aucune odeur ne se manifeste. Si on mélange le contenu des deux mortiers, on perçoit presque aussitôt l'odeur d'essence de moutarde.

Une douzaine de graines suffit pour réaliser l'expérience.

Préparation de l'extrait diastasique de malt

407. — Le malt, obtenu en faisant germer des grains d'orge et en les soumettant ensuite à la dessiccation, est très riche en diastases. Le malt commercial, étant débarrassé de ses radicelles, présente à peu près l'apparence de l'orge ; il en diffère en ce que ses grains sont très friables et d'une légère saveur aromatique.

Pour obtenir une solution douée d'une grande activité vis-à-vis de l'amidon, on fait macérer 20 grammes de malt, réduits en farine dans un moulin, avec cinq fois leur poids d'eau froide, pendant quatre à cinq heures, en agitant de temps à autre. On passe ensuite à travers un petit carré de toile fine placé sur un entonnoir, on exprime le résidu en tordant la toile et on filtre le liquide obtenu à travers un papier serré, ou bien on centrifuge. La solution limpide renferme à la fois de l'amylase, diastase liquéfiante, et de la dextrinase, diastase saccharifiante.

Liquéfaction de l'empois d'amidon par l'amylase

408. — A la température de 80-85°, la dextrinase est rapidement détruite, mais l'amylase conserve presque toute son activité. En faisant agir l'extrait de malt sur l'amidon à cette température, on observera donc presque exclusivement l'action de cette dernière diastase.

On prépare un empois d'amidon de la manière suivante : on délaie 6 grammes d'amidon dans 10 centimètres cubes d'eau et on verse ce lait d'amidon dans 90 centimètres cubes d'eau portée à l'ébullition dans un ballon, en agitant vivement. On a ainsi un empois homogène demi-solide, dans lequel on plonge aussitôt un thermomètre, et qu'on laisse refroidir jusqu'à 85°. On ajoute alors 1 centimètre cube d'un extrait de malt limpide, préparé comme ci-dessus, et on secoue le mélange. La masse se fluidifie rapidement et complètement ; on la porte alors à l'ébullition. Il s'est produit une simple dissolution de l'amidon, sans saccharifi-

eation : le liquide bleuit par l'iode et ne réduit pour ainsi dire pas la liqueur de Fehling.

Saccharification diastasique de l'amidon

409. — Lorsque l'on fait agir l'extrait de malt sur l'empois d'amidon à une température qui ne dépasse pas 70°, il y a simultanément liquéfaction par l'amylase et saccharification par la dextrinase. La quantité de sucre formé est d'autant moins grande que la température est plus élevée ; pour une expérience rapide, il est commode d'opérer vers 65° à 70°. On s'arrête souvent lorsque le liquide ne prend plus de coloration par l'iode ; il faut bien remarquer que la formation de sucre continue encore si on poursuit l'opération après avoir atteint ce point.

410. — On prépare comme il a été indiqué ci-dessus 100 centimètres cubes d'un empois d'amidon à 3 $^0/_0$ (au lieu de 6 $^0/_0$). On fait refroidir jusqu'à 65-70° et on ajoute 2 centimètres cubes d'extrait de malt (§ **407**). On maintient la température entre 65° et 70° au bain-marie muni d'un régulateur et l'on suit la saccharification de la manière suivante. Dans un certain nombre de tubes, on verse 10 centimètres cubes d'eau et 2 à 3 gouttes de solution d'iode à 1 $^0/_0$; toutes les deux ou quatre minutes, par exemple, selon l'activité de l'extrait de malt employé, on prélève 1 centimètre cube du liquide de saccharification que l'on verse dans un des tubes. On obtient ainsi une gamme de colorations depuis le bleu du début jusqu'à une teinte nulle, en passant par le violet, le rouge, le marron et le jaune. Vérifier

qu'à la fin le liquide réduit énergiquement la liqueur de Fehling, à cause de la formation du maltose. Additionné de 4 à 5 volumes d'alcool, ce liquide précipite en blanc, par suite de la présence de dextrine.

411. — *Formation de la maltosazone.* Si on évapore au bain-marie, de façon à chasser l'alcool, le liquide

Fig. 41. — Maltosazone.
A, Faible grossissement.

filtré après la précipitation de la dextrine, on a une solution de maltose qui donne par l'acétate de phénylhydrazine de la maltosazone. Pour obtenir celle-ci, on prend 10 centimètres cubes du liquide provenant de la saccharification, on ajoute 40 centimètres cubes d'alcool à 96°, on filtre et on chauffe au bain-marie dans une capsule de manière à chasser l'alcool, puis on transvase dans un tube à essai avec 5 centimètres cubes de la solution d'acétate de phénylhydrazine (voir § **91**).

On chauffe de nouveau au bain-marie pendant une heure ; on laisse refroidir ; le liquide jaune abandonne des cristaux de maltosazone qu'on examine au microscope (*fig.* 41). On vérifie qu'ils sont assez solubles dans l'eau bouillante et très solubles dans l'alcool méthylique.

Saccharification du glycogène par l'amylase salivaire

412. — La salive contient une amylase qui saccharifie énergiquement l'amidon et le glycogène, en les transformant en maltose et dextrine.

On peut réaliser facilement l'expérience, en faisant dissoudre 1 gramme de glycogène, préparé comme au § **133**, dans 5 centimètres cubes d'eau tiède, placés dans un tube à essai, et ajoutant 5 centimètres cubes de salive filtrée [1].

Après avoir mélangé, on maintient le liquide à 40°, dans un bain-marie à température réglée, pendant une heure. On vérifie que le liquide ne se colore plus par l'iode. Si on ajoute alors 2 volumes d'alcool, on a un précipité blanc de dextrine ; le liquide filtré réduit fortement et on peut en extraire de la maltosazone en opérant comme au § **411**.

[1] On peut se procurer facilement de la salive en plaçant sur la pointe de la langue une goutte d'éther ou de chloroforme ; il se produit une abondante sécrétion que l'on recueille dans un verre et que l'on filtre.

Dosage approché des produits de la saccharification par la densité de la solution

413. — On sait qu'une solution de glucose, de maltose ou de dextrine à 10 $^0/_0$ possède une densité égale à 1,0393 ; une solution à 1 $^0/_0$ a une densité de 1,0039, ce qui fait que l'excès de la densité sur l'unité est presque exactement proportionnel à la concentration. Si on détermine cette densité, à 15°, avec un densimètre sensible, on aura donc la richesse en produits dissous en divisant l'excès de la densité sur l'unité par le facteur 3,93 et multipliant par 1000. La méthode s'applique aux mélanges de sucres comme aux produits de la saccharification de l'amidon ; elle est très rapide et peut être utilisée, conjointement à la mesure du pouvoir réducteur, dans l'analyse des mélanges de maltose et de dextrine.

Monobutyrinase du sérum

414. — Le sérum sanguin de divers animaux, lapin, cobaye, cheval, etc., renferme un ferment capable de saponifier les éthers-sels à acides organiques (acétate, butyrate, etc., d'éthyle, d'amyle) et les monoéthers de la glycérine, spécialement la monobutyrine. Comme il n'agit pas sur les graisses neutres, dédoublées seulement par les diverses lipases, on lui a donné le nom de monobutyrinase.

415. — Pour montrer l'action du sérum sur la mono-

butyrine, on peut se contenter de mesurer, par titrage acidimétrique, la quantité d'acide butyrique mise en liberté ; on voit que cette quantité, mesurée pour un temps donné, est d'abord assez élevée, mais qu'elle diminue avec la durée de la saponification, parce que l'acide exerce une action empêchante.

On verse dans cinq tubes à essai 10 centimètres cubes d'une solution aqueuse saturée de monobutyrine. Dans le premier, on ajoute 1 centimètre cube de sérum de cheval préalablement porté à l'ébullition avec 1 centimètre cube d'eau, dans les quatre autres 1 centimètre cube de sérum frais. On ajoute à chaque tube 1 goutte de phtaléine, et on neutralise avec une solution de carbonate de sodium à 0,5 $^0/_0$, jusqu'à teinte rose persistant un moment. Les tubes sont alors placés au bain-marie réglé à 35-37°.

Après quinze minutes, on vérifie que le contenu du témoin est resté neutre ; le tube 1 est devenu acide, et on compte le nombre de gouttes de la solution de carbonate de sodium nécessaires à la neutralisation ; soit a ce nombre. Au bout de quinze nouvelles minutes, on voit que, pour neutraliser ce même tube, il faut verser à peu près a gouttes de carbonate de sodium ; or, à ce moment, le tube 2 n'exige qu'un nombre de gouttes $b < 2a$, ce qui signifie que l'action n'est pas proportionnelle au temps, mais va en se ralentissant. On le vérifie de nouveau en examinant le tube 3 après quarante-cinq minutes et le tube 4 après soixante minutes. Le ralentissement est dû à l'acide butyrique mis en liberté, car, si on le neutralise, l'action redevient identique à ce qu'elle était au début.

416. — On peut mesurer l'action de la monobutyrinase du sérum sur la monobutyrine en s'appuyant sur la diminution que subit la tension superficielle du liquide pendant la saponification (Rona et Michaelis).

Pour cela, après avoir mélangé 20 centimètres cubes de solution saturée de monobutyrine avec 1 centimètre cube de sérum frais de cheval et 3 centimètres cubes d'eau, on aspire le liquide dans le compte-goutte de Duclaux (§ **498**), on essuie l'ajutage inférieur de celui-ci, et on compte le nombre de gouttes qui s'écoulent de l'appareil. Ce nombre est voisin de 160; il varie avec la température. On recommence cette opération après quinze, trente, quarante-cinq minutes.

On peut voir que les nombres obtenus décroissent régulièrement. En portant en abcisses les temps et en ordonnées le nombre de gouttes correspondant, on peut construire la courbe représentative du phénomène.

Si on prépare une expérience témoin, en faisant un mélange de 20 centimètres cubes de la même solution de monobutyrine avec 4 centimètres cubes de sérum préalablement dilué au 1/4 et chauffé à 80° pendant une demi-heure, on peut voir que le nombre de gouttes données par ce mélange ne varie pas avec le temps.

Saponification de l'acétate et du butyrate d'éthyle par la monobutyrinase

417. — Les éthers des acides gras monobasiques sont saponifiés par la monobutyrinase du sérum avec une vitesse d'autant plus grande que le poids molécu-

laire du radical acide est plus considérable. Ainsi le butyrate d'éthyle est saponifié au moins 10 fois plus vite que l'acétate d'éthyle.

Pour le vérifier, on émulsionne 1 centimètre cube de butyrate d'éthyle avec 100 centimètres cubes d'eau, par une agitation énergique ; on répartit dans des tubes à essai, de manière à verser dans chaque tube 10 centimètres cubes du liquide. On ajoute 1 goutte de phtaléine, puis on neutralise exactement avec la solution de carbonate de sodium à 0,5 $^0/_0$, jusqu'à légère teinte rosée. On ajoute à chacun des tubes 1 centimètre cube de sérum frais de cheval ; l'un de ces tubes étant aussitôt porté à l'ébullition servira de témoin.

D'autre part, on fait une solution d'acétate d'éthyle contenant $0^{cm3},75$ de cet éther pour 100 centimètres cubes (solution équimoléculaire avec celle de butyrate d'éthyle), et on opére avec elle exactement comme pour le liquide précédent.

Les tubes sont alors placés en même temps dans un bain-marie réglé à 55-60°, ainsi que les témoins. On constate que ceux-ci gardent leur teinte rose, tandis que les autres tubes se décolorent, parce que leur contenu s'acidifie.

Après cinq minutes, on retire un tube à butyrate et un tube à acétate d'éthyle, on les fait refroidir, puis on les neutralise au moyen de la solution de carbonate de sodium à 0,5 $^0/_0$, en comptant le nombre de gouttes de solution versées dans chaque tube. On retire de nouveau deux tubes cinq minutes après, et ainsi de suite. On peut alors construire les courbes qui expriment l'intensité de la saponification des deux éthers en fonction du temps ; on voit que le dédoublement du buty-

rate d'éthyle est incomparablement plus rapide que celui de l'acétate.

Étude de la lipodiastase des graines de ricin

418. — Les graines grasses renferment une diastase lipolytique presque inactive en milieu neutre, mais dont l'action devient au contraire très rapide en présence d'un acide organique ou minéral, tel que l'acide acétique ou l'acide sulfurique. Les graines de ricin se prêtent particulièrement à l'étude de cette diastase. On peut opérer de la manière suivante :

On décortique soigneusement des graines de ricin et l'on en pèse 5 grammes (soit 25 à 30 graines) que l'on broie en pâte fine dans un mortier. On y ajoute alors 7 centimètres cubes d'huile de ricin [1] et 4 centimètres cubes d'eau, on mélange bien, puis on verse le mélange dans un verre à pied, en s'aidant d'une carte pour détacher les parties adhérentes au mortier. On prépare ensuite un second mélange de graines et d'huile exactement semblable et on y incorpore, au lieu d'eau, 4 centimètres cubes d'une solution d'acide acétique à 2,5 % (ou 4 centimètres cubes d'acide sulfurique décime). On verse ce deuxième mélange dans un verre, et on laisse en contact pendant une heure, à la température ordinaire.

---

[1] L'huile de ricin possède une viscosité qui empêche de la mesurer facilement à l'aide d'une pipette ; on peut la rendre fluide en la chauffant légèrement, vers 40° ; la mesure n'offre alors aucune difficulté. Pour nettoyer les vases qui ont contenu de l'huile de ricin, on utilisera la propriété que possède celle-ci de se dissoudre facilement dans l'alcool fort.

Après ce temps, on verse dans chaque verre 25 centimètres cubes d'alcool à 95°, on agite, et on titre l'acidité à la soude normale, en présence de quelques gouttes de phtaléine. On peut ainsi s'assurer que l'acidité du premier mélange est extrêmement faible; celle du second, dont il convient de déduire l'acidité due aux 4 centimètres cubes d'acide acétique ajoutés, que l'on titre à part (et qui correspondent à $1^{cm3},5$ environ de soude normale), est en revanche considérable ; la quantité d'acides gras mis en liberté par saponification peut s'élever en effet à 40 ou 50 % de la quantité totale présente dans l'huile.

Si on porte à 100° dans un bain-marie en ébullition, pendant dix minutes, le mélange de graines et d'huile de ricin, avant de l'acidifier par l'acide acétique, on voit que l'acidité ne varie pas : il n'y a pas saponification. Il s'agit bien d'une action diastasique, favorisée par une légère acidité initiale.

Étude d'une présure végétale

419. — La présure est très répandue chez les végétaux. On peut mettre sa présence en évidence dans le suc obtenu par expression des feuilles, des fleurs ou des fruits d'un grand nombre de plantes.

Pour étudier une présure végétale, on s'adressera à l'artichaut commun. Un artichaut, débarrassé au préalable des feuilles (bractées), est broyé dans un hache-viande et exprimé à la presse. Le jus trouble obtenu est filtré.

On place dans 5 tubes à essai 10 centimètres cubes de lait et on ajoute respectivement $0^{cm3},5$, 1, 2, 3 cen-

timètres cubes du jus d'artichaut dans quatre des tubes. Le dernier reçoit 1 centimètre cube de liquide préalablement porté à l'ébullition.

On plonge les tubes dans l'eau d'un bain-marie réglé à 50°, et on les examine de temps à autre. La coagulation commence au bout de quelques minutes dans le tube contenant 3 centimètres cubes ; il est facile de voir, en notant les temps de coagulation, qu'ils sont inversement proportionnels aux quantités de présure.

La coagulation ne se produit pas, même après plusieurs heures, dans le tube contenant la présure chauffée.

Influence des sels de calcium sur la coagulation du lait par la présure

420. — La coagulation du lait par la présure est due à ce fait que la caséine modifiée par l'action diastasique donne avec le calcium une combinaison insoluble. Si on élimine préalablement le calcium par un réactif convenable (oxalate ou fluorure alcalin, par exemple), la transformation diastasique a lieu, mais non la coagulation.

L'expérience suivante montre bien cette influence.

Dans cinq tubes à essai, on verse 10 centimètres cubes de lait frais et non additionné d'antiseptique (un certain nombre de laits du commerce sont rendus incoagulables). On ajoute au premier tube $0^{cm3},1$ de solution de présure [1], préalablement bouillie pendant

[1] Présure liquide du commerce ou solution de présure en poudre à 1 % environ.

quelques minutes ; ce tube ne coagule pas dans les conditions de l'expérience.

Le second reçoit $0^{cm3},1$ de présure active ; les tubes 3 et 4 reçoivent chacun $0^{cm3},5$ d'une solution d'oxalate de sodium à 2 $^0/_0$, puis, après mélange, la même dose de présure ; enfin le tube 5 reçoit simplement $0^{cm3},1$ d'une solution de chlorure de calcium à 10 $^0/_0$. Tous les tubes étant placés pendant cinq à dix minutes dans un bain-marie réglé à 35°, on voit qu'après ce temps le tube 2 seul est coagulé. Les tubes 3 et 4, dans lesquels on a précipité les sels de calcium par l'oxalate, n'ont pas coagulé ; cependant la caséine y est déjà transformée par la présure, car si on porte le tube 3, par exemple, à l'ébullition, on obtient un précipité floconneux, ce que ne fait pas le lait normal. Si on ajoute 1 goutte de la solution de chlorure de calcium au tube 4 contenant aussi du lait oxalaté et emprésuré, on a une coagulation immédiate ; cependant le caillot est moins compact que dans le tube 2. Le tube 5 permet de constater que le chlorure de calcium seul n'a aucune influence sur la coagulation du lait.

Détermination de la force coagulante d'une présure commerciale

421. — On appelle conventionnellement force coagulante d'une présure commerciale le rapport du volume de lait coagulé au volume de présure employé, l'opération ayant lieu à la température de 35° et la coagulation se faisant en quarante minutes.

Pour la déterminer, on opère de la manière suivante :

On prépare 10 tubes à essai contenant chacun 10 centimètres cubes de lait, puis on leur ajoute respectivement $0^{cm3},1$; $0^{cm3},2$; $0^{cm3},3$; etc..., 1 centimètre cube de la présure à étudier, préalablement diluée au 1/100. On ramène les volumes à 11 centimètres cubes avec de l'eau (on ajoute $0^{cm3},9$; $0^{cm3},8$; $0^{cm3},7$, etc. d'eau), on agite, et on place au bain-marie réglé à 35°. On examine les tubes de temps à autre, et on note au bout de combien de temps la coagulation est complète ; on peut alors retourner le tube sans que le coagulum se brise et se détache. Si l'un des tubes paraît ne coaguler qu'en quarante minutes, on détermine le rapport du volume de lait au volume de présure qu'il renferme ; on a ainsi la force coagulante cherchée. Par exemple, s'il s'agit du tube contenant $0^{cm3},4$ de la dilution de présure, le rapport est :

$$\frac{10}{0,004} = 2.500$$

Si tous les tubes coagulent en moins de quarante minutes, on recommence l'opération en diluant la présure à 1/200 ou davantage.

On peut facilement se rendre compte, dans cette expérience, que la durée de coagulation est, à très peu près, inversement proportionnelle à la quantité de présure.

Coagulation diastasique du sang

422. — La coagulation spontanée du sang est produite par l'action du fibrine-ferment sur le fibrinogène. Cette diastase provient de l'action des sels de calcium

contenus dans le sang sur une substance (profibrine-ferment) que sécrètent les leucocytes soustraits aux conditions naturelles de leur existence. Si on prive le sang du calcium qu'il renferme au moyen d'un oxalate alcalin, la sécrétion leucocytaire se produit, mais la coagulation n'a pas lieu. Aussi le plasma oxalaté, débarrassé de globules par une centrifugation prolongée, coagule par addition de quelques gouttes d'une solution de chlorure de calcium.

L'addition de fluorure de sodium au sang ne précipite pas seulement le calcium, elle arrête en même temps la sécrétion leucocytaire, de sorte que le plasma fluoré, centrifugé pour le débarrasser des cellules, ne coagule pas si on lui ajoute un sel de calcium.

423. — On opérera comme il suit pour réaliser cette expérience. Le plasma oxalaté ou fluoré est obtenu en recevant directement le sang d'un animal (cheval par exemple) dans une éprouvette à pied contenant, soit 5 centimètres cubes d'une solution d'oxalate de sodium à 2 $^0/_0$, soit 10 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 3 $^0/_0$, pour chaque volume de 100 centimètres cubes de sang. (La proportion convenable est, en effet, d'environ 0,1 $^0/_0$ pour l'oxalate, et 0,3 $^0/_0$ pour le fluorure.) Après mélange, le sang est centrifugé ; le plasma peut être facilement séparé du dépôt au moyen d'un siphon ou d'une pipette.

Si à 10 centimètres cubes de plasma oxalaté on ajoute 10 gouttes d'une solution de chlorure de calcium à 10 $^0/_0$, la coagulation ne tarde pas à se produire. Dans les mêmes conditions, le plasma fluoré ne coagule pas. Si à 10 centimètres cubes de plasma oxalaté ou fluoré

on ajoute 1 centimètre cube de sérum, contenant du fibrine-ferment tout formé, la coagulation se produit aussi bien dans l'un que dans l'autre.

Essai de la pepsine commerciale

424. — Il n'existe pas actuellement de définition du pouvoir digestif de la pepsine; d'après le Codex français, les pepsines commerciales doivent répondre à l'essai ci-dessous, pour être utilisables en pharmacie.

On dissout 0gr,10 de pepsine à essayer dans un volume convenable d'acide chlorhydrique à 1 %, par exemple 60 centimètres cubes, et on ajoute 2gr,50 de fibrine desséchée à basse température. (Il est préférable de faire gonfler auparavant cette fibrine dans une partie de la solution acide.) Ce mélange est placé dans un bain-marie réglé à la température de 50° et agité de temps en temps; au bout de peu d'instants, la fibrine se gonfle, puis se dissout peu à peu. Le liquide donne avec intensité les diverses réactions de précipitation des albumoses; la réaction du biuret devient de plus en plus intense.

Après six heures, on laisse refroidir, on filtre, et on prélève 10 centimètres cubes du liquide : celui-ci, refroidi jusqu'à 15° sous un courant d'eau froide, ne doit plus se troubler par addition de 10 à 20 gouttes d'acide nitrique étendu; les autres réactions des albumoses ont disparu, celles des peptones persistent seules.

Il est plus facile d'employer pour cet essai de la fibrine fraîche, préparée extemporanément en lavant de la fibrine brute (provenant de l'abattoir) jusqu'à

décoloration complète, ou de la fibrine conservée dans la glycérine [1]. Dans ce dernier cas, on la lave à l'eau pour enlever la glycérine et on l'essore entre des doubles de papier. On emploiera 10 grammes de fibrine essorée et on dissoudra la pepsine dans un mélange d'eau ($46^{cm3},5$) et d'acide chlorhydrique à 10 % (6 centimètres cubes), de manière à tenir compte de la quantité d'eau contenue dans la fibrine.

C'est là un essai purement conventionnel qui ne donne aucun renseignement sur la nature des produits formés et ne fournit qu'une limite inférieure de l'activité.

425. — Si l'on veut comparer l'activité de diverses préparations de pepsine, il faut les faire agir dans des conditions déterminées sur un excès de sérum et doser ensuite, par la méthode de Sörensen, la quantité de groupements aminés mis en liberté. On opère de la manière suivante :

On prend pour chaque essai 10 centimètres cubes de sérum de cheval, auquel on ajoute $0^{cm3},7$ d'acide chlorhydrique normal, exactement mesuré, de manière à avoir une acidité d'environ 2,5 p. 1000 en HCl.

On introduit une quantité connue de solution de pepsine, telle qu'elle ne puisse digérer la totalité de la matière protéique (c'est-à-dire qu'il reste des albumoses précipitables par le sulfate d'ammonium à saturation), on abandonne le tout dans une étuve à 37°

---

[1] Il convient d'employer 3 à 4 parties de glycérine pour 1 partie de fibrine, afin d'éviter l'autodigestion qui pourrait se produire si la fibrine était insuffisamment déshydratée. Malgré cette précaution, la conservation n'est assurée que pour quelques mois.

pendant un nombre d'heures déterminées, puis on titre par la méthode de Sörensen (voir § **319**). Les activités de diverses préparations pourront être considérées comme proportionnelles aux quantités d'alcali utilisées pour la saturation des carboxyles.

Essai de la trypsine commerciale

426. — On fait digérer au bain-marie, à la température de 50°, un mélange de $2^{gr},50$ de fibrine sèche avec 60 centimètres cubes d'eau, dans laquelle on a fait dissoudre $0^{gr},20$ de la trypsine à essayer. On agite de temps en temps et on constate que la fibrine se dissout peu à peu; le liquide donne les réactions des albumoses. Au bout de six heures, ces réactions ont disparu, le liquide ne se trouble plus par addition ménagée d'acide nitrique étendu et ne contient plus que des peptones [1]. Si la digestion est continuée, on voit peu à peu la réaction du biuret diminuer d'intensité, et le liquide refroidi laisse déposer des cristaux de tyrosine, faciles à reconnaître au microscope (§ **314**).

On peut employer de la fibrine fraîche, essorée entre des doubles de papier à filtrer; on prend dans ce cas 10 grammes de fibrine fraîche et $52^{cm3},5$ d'eau pour tenir compte de l'eau contenue dans la fibrine.

---

[1] Ce mode opératoire, indiqué par le Codex 1908, ne conduit presque jamais à la digestion complète de la fibrine; une partie de celle-ci ne se dissout pas, et la réaction des albumoses ne disparaît pas dans le temps indiqué.

Il serait préférable de remplacer l'eau distillée par une solution alcaline, soude très étendue (soude N/100, par exemple), ou carbonate de sodium (à 1 gramme par litre de sel cristallisé).

Comme la digestion pepsique, la digestion trypsique peut être suivie par la titration des acides aminés au moyen de la méthode de Sörensen (§ **319**).

427. — Il faut remarquer que les préparations commerciales de pancréas possèdent presque toujours, à côté de l'action protéolytique, une forte action amylolytique. On essaie leur activité à ce point de vue en mélangeant une solution de $0^{gr},01$ de pancréatine dans 10 centimètres cubes d'eau à 90 centimètres cubes d'empois d'amidon à 6 $^0/_0$ refroidi vers 55° et maintenant à cette température. L'empois est rapidement liquéfié et le liquide ne tarde pas à devenir fortement réducteur. On pourra vérifier la formation du maltose et de la dextrine comme au § **410**.

Action de la papaïne sur les substances protéiques du sérum

428. — La papaïne possède une action digestive qui croît rapidement avec la température jusque vers 90° ; il en résulte que si on chauffe à 100° une matière protéique, en présence de papaïne, la digestion peut se produire pendant le temps nécessaire à élever la température du liquide jusqu'à ébullition.

Dans deux tubes à essai, on verse 2 centimètres cubes d'une solution de papaïne à 5 $^0/_0$; l'un de ces tubes est porté à 100° avec son contenu, pendant deux minutes.

On ajoute alors dans les deux tubes 10 centimètres cubes de sérum *frais* de cheval, on mélange et on plonge

dans l'eau d'un bain-marie que l'on chauffe jusqu'à l'ébullition ; on maintient jusqu'à ce qu'un thermomètre, placé dans le tube contenant la papaïne non bouillie, marque 98-99°. On retire alors les deux tubes : l'un est plein d'un liquide un peu trouble, l'autre (celui qui contenait la diastase bouillie) est coagulé. Si on filtre le contenu des tubes, on voit que le dernier laisse passer un liquide très pauvre en substances protéiques : il n'y a pas eu digestion.

Celui qui a été soumis à l'action de la diastase active fournit, au contraire, un liquide qui donne les réactions des albumoses; il ne reste pas de coagulum sur le filtre, tant la digestion a été rapide et complète.

La papaïne du commerce perdant assez rapidement son activité, on ne doit faire usage que de préparations récentes.

Étude de l'uréase végétale

429. — On peut extraire une uréase très active de certaines graines et en particulier de celle de soja (Glycine hispida). Les graines broyées dans un moulin sont dégraissées et simplement mises à macérer avec de l'eau.

On prend 10 grammes de graine de soja que l'on écrase dans un mortier ou que l'on broie dans un moulin à café, et on les fait macérer pendant une demi-heure dans l'éther de pétrole. On décante avec soin tout l'éther, on le remplace par du dissolvant neuf, et on fait de nouveau macérer pendant une demi-heure. Après cinq à six opérations semblables, les matières

grasses sont enlevées. On essore la farine entre deux feuilles de papier à filtrer et on sèche à l'étuve à 35° pendant une ou deux heures.

La poudre obtenue est alors mise à macérer pendant 4 à 6 heures avec 5 fois son poids d'eau, en agitant de temps à autre. On filtre ou on essore à la trompe, et on obtient un liquide limpide qui est très riche en uréase.

430. — Pour apprécier l'activité de ce liquide, on verse dans 6 tubes à essai 10 centimètres cubes de solution d'urée N/5 (soit à 1,2 $^0/_0$), et on ajoute dans les cinq premiers 1 centimètre cube de solution diastasique, le dernier recevant le même volume de solution préalablement portée à l'ébullition. On abandonne à la température ordinaire (20-25°). Après des temps déterminés, 5, 10, 15, 20, 25 minutes, on retire successivement les tubes et on verse dans chacun d'eux 2 centimètres cubes d'acide sulfurique normal ; on porte à l'ébullition pour chasser le gaz carbonique, et on ramène à la neutralité par la soude décime, en présence d'orangé. On peut ainsi facilement mesurer la quantité d'ammoniaque formée aux dépens de l'urée.

CHAPITRE XVIII

OXYDASES

Préparation d'une solution de laccase

431. — On peut obtenir facilement une solution de laccase très active en faisant macérer dans la glycérine certains champignons, appartenant surtout aux genres Russule et Lactaire. On peut aussi, faute de mieux, utiliser le champignon de couche, dont on prendra seulement la moitié inférieure du pied.

Les champignons riches en laccase se reconnaissent aisément : lorsqu'on les brise et que l'on verse une goutte de teinture de gaïac [1] sur la section fraîche, on voit apparaître immédiatement une coloration bleue intense.

Pour obtenir la macération glycérinée, on coupe en

---

[1] La teinture de gaïac se prépare en faisant dissoudre à chaud 5 grammes de résine de gaïac dans 60 à 70 centimètres cubes d'alcool à 96°, filtrant et ajoutant 30 centimètres cubes d'eau environ. Cette préparation doit être faite au moment du besoin : en effet la teinture de gaïac se peroxyde avec le temps, de telle sorte qu'elle fournit alors avec l'eau une émulsion qui peut se colorer en bleu par la peroxydiastase, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter de l'eau oxygénée. C'est là une cause d'erreur à éviter.

fragments ces champignons soigneusement débarrassés de leur couche superficielle et on les introduit dans un flacon à large ouverture avec deux fois leur poids de glycérine à 30° B. On bouche et on conserve la macération à l'obscurité pendant quelques jours.

Il suffit de filtrer, au moment de l'usage, la quantité désirée de liquide. L'activité de celui-ci s'atténue assez rapidement après filtration ; elle persiste longtemps sans altération, si le liquide est conservé au contact du champignon.

Réactions colorées de la laccase

432. — La laccase agit sur un certain nombre de polyphénols, au contact de l'oxygène, et les transforme en produits de nature quinonique. Les phénols sont d'autant plus attaquables qu'ils peuvent fournir des quinones avec plus de facilité ; les dérivés para (hydroquinone) sont les plus oxydables, puis viennent les ortho (gaïacol, pyrogallol) ; les méta sont à peine attaquables. Les corps dans lesquels les oxhydriles phénoliques sont remplacés, en tout ou en partie, par des groupements NH^2 se comportent de la même manière.

433. — Certains composés sont oxydés avec une très grande rapidité ; de ce nombre sont l'acide gaïaconique de la résine de gaïac et le gaïacol, qui donnent, le premier un dérivé d'un beau bleu, le second, de la tétragaïacoquinone colorée en rouge grenat. Pour faire l'expérience, on verse $0^{cm3},5$ de solution de laccase dans quatre tubes à essai et on étend avec 2 centimètres

cubes d'eau. On porte à l'ébullition le contenu de deux de ces tubes, qui serviront de témoins. On verse alors dans un tube bouilli et dans un tube non bouilli 10 centimètres cubes d'eau et 1 centimètre cube de teinture fraîche de gaïac et on mélange : le tube bouilli reste blanc laiteux, l'autre se colore peu à peu en bleu indigo.

Dans les deux autres tubes, on verse 10 centimètres cubes de solution de gaïacol à 1 $^0/_0$: le témoin (bouilli) reste incolore ; l'autre se colore peu à peu en rose, puis en rouge foncé, par suite de la formation de tétragaïacoquinone qui se précipite finalement sous forme d'une poudre cristalline.

434. — L'hydroquinone et le pyrogallol sont également transformés par la laccase en produits d'oxydation bien définis ; l'hydroquinone donne de la quinone qui se combine avec le phénol en excès pour donner de la quinhydrone peu soluble, se précipitant en lamelles à reflets mordorés, tandis que le pyrogallol fournit de la purpurogalline sous forme d'une poudre jaune brun très peu soluble.

On peut produire ces dérivés en plaçant dans un tube à essai 10 centimètres cubes d'une solution d'hydroquinone à 2 $^0/_0$ ou de pyrogallol à 1 $^0/_0$ et ajoutant $0^{cm3},5$ de macération glycérinée de champignons. Il se produit rapidement une coloration jaune ; après quelques heures, la précipitation de la quinhydrone ou de la purpurogalline est commencée.

On vérifiera que la purpurogalline donne avec l'eau une solution colorée en jaune, prenant par addition d'ammoniaque une belle teinte bleu foncé.

Action des acides sur la laccase

435. — Au point de vue de leur action sur la laccase, les acides peuvent se ranger en deux groupes : les uns entravent ou paralysent son action, même à des doses extrêmement faibles (sulfurique, chlorhydrique, acétique, oxalique, etc.) ; ce sont tous ceux qui ont une réaction acide à l'hélianthine. Les autres sont presque sans action, même à dose élevée ; ce sont ceux qui n'influencent pas cet indicateur (acides carbonique, borique, auxquels il faut ajouter des sels acides comme le phosphate monopotassique, le citrate bisodique, etc.).

Les acides actifs vis-à-vis de la laccase possèdent la même activité en solution équimoléculaire.

436. — On versera dans une série de tubes à essai 10 centimètres cubes d'une solution de gaïacol à 1 $^0/_0$ et on ajoutera dans trois tubes respectivement 1, 2, 3 gouttes d'acide sulfurique N/20. Un quatrième recevra 10 gouttes d'une solution contenant 10 $^0/_0$ de phosphate monopotassique et 10 $^0/_0$ de phosphate bipotassique, un cinquième, resté sans addition, sert pour la comparaison. On verse finalement dans chacun de ces cinq tubes $0^{cm3},1$ d'une solution de laccase extraite du latex de l'arbre à laque à 2,5 $^0/_0$, et on mélange. On voit la coloration rouge apparaître au bout de cinq à dix minutes dans le tube 4, contenant les phosphates, et dans le tube 5, resté sans addition d'aucune sorte. Elle n'apparaît que beaucoup plus tard dans le tube 1, pas du tout dans les tubes 2 et 3.

Si on examine au papier de tournesol la réaction de ces deux tubes, on voit qu'ils ne paraissent pas acides au tournesol ; en ajoutant à leur contenu 10 gouttes de la solution des phosphates, qui rougit fortement le tournesol, on voit l'action de la laccase reparaître ; la coloration rouge se produit bientôt, parce que l'acide libre a été remplacé par du phosphate acide qui ne gêne pas.

437. — L'expérience est bien moins nette en présence de certains sels, par exemple lorsqu'on utilise la macération glycérinée de champignons comme source de laccase. Il faut alors augmenter beaucoup la dose d'acide pour empêcher l'action oxydasique.

On fera l'expérience comme plus haut, avec cinq tubes contenant 10 centimètres cubes de gaïacol à 1 $^0/_0$, mais on ajoutera respectivement 1, 2, 3 gouttes d'acide sulfurique normal (et non N/20) aux tubes 1, 2, 3. La macération glycérinée de champignons sera filtrée au moment de l'emploi ; il suffira d'en ajouter 4 gouttes à chacun des tubes.

Comme plus haut, on peut faire apparaître la coloration rouge dans les tubes additionnés d'acide sulfurique libre en y versant 10 gouttes de la solution des phosphates.

Préparation de la tyrosinase du son

438. — Le son de froment contient de la tyrosinase, mais non de la laccase. On peut en retirer facilement la diastase oxydante.

On fait macérer une partie de son avec quatre parties

d'eau saturée de chloroforme, dans un flacon plein et bien bouché. Après quatre à cinq heures de contact, on passe à travers une toile et on exprime le résidu à la presse. Le liquide centrifugé et clair est précipité par trois fois son volume d'alcool à 96°. Le précipité, recueilli par centrifugation, est lavé avec un peu d'alcool à 80°, puis délayé dans un peu d'eau. Une certaine quantité de matières protéiques, coagulées par l'alcool, ne se redissolvent pas. On centrifuge de nouveau, et on précipite la solution diastasique par trois à quatre volumes d'alcool. Le précipité est recueilli et desséché dans le vide, sur l'acide sulfurique.

Ce précipité est entièrement soluble dans l'eau ; la solution ne colore pas l'émulsion de résine de gaïac ni la solution de gaïacol, mais en revanche elle donne avec les solutions de tyrosine, en présence de l'air, une série de colorations, rose, rouge, brun et noir.

Action de la tyrosinase sur la tyrosine

439. — On peut étudier l'action de la tyrosinase, soit en partant des préparations extraites du son de froment, soit en utilisant la macération glycérinée de certains champignons (Russules en particulier), qui est très riche en tyrosinase, comme le montre l'expérience suivante. On place dans quatre tubes 10 centimètres cubes d'une solution saturée à froid de tyrosine, et on y ajoute respectivement $0^{cm3},1$; $0^{cm3},2$; $0^{cm3},3$ et $0^{cm3},4$ de macération glycérinée. Au bout d'un temps variable (noter sa durée), une coloration rose apparaît dans les tubes ; ce temps est inversement proportionnel

aux quantités de diastase ajoutées. Après quelques moments, la coloration passe au rouge ; plusieurs heures après, on trouve la surface du liquide colorée en noir, le fond étant rouge ; l'oxydation est donc d'autant plus grande que les couches sont plus superficielles.

On fera un témoin en portant à l'ébullition dans un cinquième tube $0^{cm3},5$ de macération glycérinée avec 2 centimètres cubes d'eau, puis ajoutant 5 à 10 centimètres cubes de solution de tyrosine ; il ne se produit aucune coloration dans ce tube.

La tyrosinase peut également oxyder un certain nombre de monophénols, comme le phénol ordinaire, le paracrésol, et divers aminophénols.

Distinction des peptones pepsique et trypsique par la tyrosinase

440. — On peut distinguer les peptones obtenues par l'action de la pepsine de celles qui résultent de l'action de la trypsine par la coloration qu'elles fournissent lorsqu'on additionne leur solution aqueuse de tyrosinase (Harlay).

Les premières donnent une coloration rouge devenant verte après quelque temps, les secondes une coloration rouge passant au brun, puis au noir, au bout de quelques heures. Le liquide doit être parfaitement neutralisé avant l'addition de la diastase, sinon les colorations indiquées ne se produisent pas.

Les peptones trypsiques donnent, de plus, avec l'eau de brome, la réaction du tryptophane.

Séparation de la laccase et de la tyrosinase par la chaleur

441. Les macérations glycérinées de champignons renferment à la fois de la laccase et de la tyrosinase. Il est facile de séparer ces deux diastases par l'action de la chaleur, qui détruit facilement la tyrosinase, tandis que la laccase est très résistante. La température mortelle de la tyrosinase varie un peu, suivant son origine; c'est ainsi que celle du champignon de couche est détruite par un chauffage de trois minutes à 65-70°, celle de *Russula queletti* à 70-75°, et la tyrosinase du son seulement à 90-95°.

442. — Pour faire la séparation des oxydases contenues dans une macération glycérinée, on prend une série de tubes à essai et on introduit 1 centimètre cube de macération dans chacun des tubes. On plonge trois de ces tubes dans l'eau d'un bain-marie chauffé à 65° et, lorsque la température du liquide diastasique, prise au moyen d'un thermomètre placé dans l'un des tubes, atteint ce degré, on compte exactement trois minutes.

On retire les tubes et on y verse respectivement 10 centimètres cubes de solution de tyrosine à 0,1 $^0/_0$ 10 centimètres cubes de gaïacol à 1 $^0/_0$ et un mélange de 2 centimètres cubes de teinture de gaïac avec quatre volumes d'eau. On voit que le premier mélange ne se colore plus, ou donne seulement une faible coloration rose, les deux autres se colorant respectivement en rouge et en bleu.

Si la tyrosinase n'était pas totalement détruite dans ces conditions, on recommencerait l'expérience, après avoir élevé la température du bain-marie à 70°; et ainsi de suite, jusqu'à ce que le tube contenant la tyrosine ne se colore plus. La macération ainsi chauffée donne toujours les réactions colorées avec le gaïacol et le gaïac, ce qui démontre la plus grande résistance de la laccase à la chaleur.

Recherche exacte des oxydases

443. — Le caractère fondamental des oxydases étant de fixer l'oxygène de l'air sur les corps oxydables, leur recherche doit être basée sur l'existence de ce caractère.

Pour rechercher la présence des oxydases dans un extrait animal ou végétal, on utilise un petit appareil formé d'un tube analogue à un tube à essai, portant deux étranglements E et E′ et auquel est soudé un tube plus étroit A terminé par une petite boule (*fig.* 42).

On place quelques gouttes de la solution étudiée dans le tube A, et 5 centimètres cubes d'un corps oxydable, gaïacol à 1 % ou tyrosine à 0,1 %, par exemple, dans le tube B. On fixe alors sur celui-ci, au moyen d'un anneau de cire Golaz, un capuchon de verre C portant un tube d'environ 20 centimètres de long, étiré en *d* en une effilure à parois épaisses.

L'appareil étant ainsi préparé, on le met en relation avec un tube en T dont l'une des branches est en relation avec une bonne trompe à eau, et l'autre avec un appareil à anhydride carbonique. On fait le vide, puis

interrompant la communication avec la trompe, on laisse rentrer dans l'appareil du gaz carbonique ; on agite un instant, pour saturer le liquide, puis on ferme

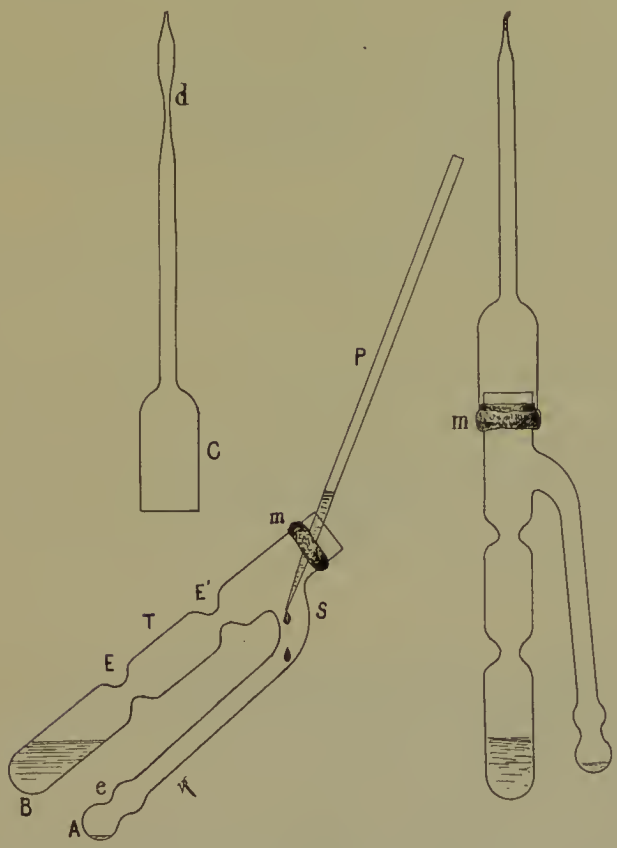


Fig. 42. — Recherche des oxydases.

le robinet de l'appareil et on fait de nouveau le vide. On renouvelle cette manœuvre trois à quatre fois, afin de purger complètement l'appareil de l'oxygène qu'il renferme. (Si on dispose d'une trompe à mercure, on peut se contenter d'un seul lavage avec le gaz carbonique.) Finalement on fait le vide aussi complètement

que possible, et on scelle le tube en chauffant, à l'aide d'une petite flamme, l'effilure *d*.

Si on retourne l'appareil, de manière à mélanger le contenu des tubes A et B, il ne se produit aucune coloration, même après plusieurs jours. Si on brise alors la pointe effilée, de manière à laisser entrer l'air, le liquide se colore peu à peu, dans le cas de la présence d'une oxydase (laccase agissant sur le gaïacol ou tyrosinase sur la tyrosine).

APPENDICE

PEROXYDIASTASE

Réaction peroxydiastasique du sang

444. — L'hémoglobine du sang agit en présence d'eau oxygénée H^2O^2 comme la laccase en présence de l'oxygène de l'air, de sorte qu'un mélange de cette substance et d'eau oxygénée donne toutes les réactions colorées de la laccase.

Dans un liquide où on soupçonne la présence de sang, on peut essayer de produire la réaction peroxydiastasique de la manière suivante. A 10 centimètres cubes du liquide on ajoute 1 centimètre cube de teinture fraîche de gaïac : l'émulsion reste d'un blanc lai-

teux. Mais si on ajoute une seule goutte d'eau oxygénée neutralisée[1], on voit se développer une coloration bleu indigo qui est un des caractères indiquant la présence possible du sang.

Application des propriétés peroxydiastasiques à la différenciation du lait cru et du lait bouilli

445. — Le lait possède une légère réaction peroxydiastasique qui disparaît lorsqu'on le porte à l'ébullition, d'où un moyen de distinguer le lait bouilli du lait cru.

Dans quatre tubes à essai, on verse 10 centimètres cubes de lait ; deux de ces tubes sont ensuite portés à l'ébullition pendant trente secondes, puis refroidis. Le refroidissement doit être complet, car le lait bouilli encore chaud donne les mêmes colorations que le lait cru.

Dans un tube de lait cru et un tube de lait bouilli, mettre $0^{cm3},5$ de teinture fraîche de gaïac : il ne se produit rien. Si on ajoute une seule goutte d'eau oxygénée neutralisée (à 4 ou 5 volumes au plus), il se développe

---

[1] Il est indispensable, avec la peroxydiastase ou la catalase, d'opérer toujours avec de l'eau oxygénée neutralisée. On prépare celle-ci en ajoutant à de l'eau oxygénée commerciale, à 10-12 volumes, toujours très acide, de l'eau de baryte jusqu'à réaction à peine alcaline ; on réacidifie aussitôt *très légèrement* par une seule goutte d'acide sulfurique et on filtre pour enlever l'abondant précipité blanc de sulfate ou de phosphate de baryum.

Lorsque l'acidité de l'eau oxygénée est due à l'acide borique, il n'est pas nécessaire de la neutraliser, cet acide n'exerçant pas d'action empêchante sur les diastases considérées.

une coloration bleue dans le lait cru, le lait bouilli restant parfaitement blanc.

La réaction est plus nette si on emploie un mélange de teinture de gaïac avec un peu de gaïacol. En ajoutant à 10 centimètres cubes de lait $0^{cm3},5$ de teinture de gaïac et deux gouttes de solution alcoolique de gaïacol à 5 $^0/_0$, on a immédiatement une coloration bleu foncé.

Dans les deux autres tubes, on verse 4 à 5 centimètres cubes de solution de gaïacol à 1 $^0/_0$, qui ne les colore pas, puis une goutte d'eau oxygénée. Le tube de lait cru se colore en rose, l'autre restant blanc.

On peut vérifier que le lait cru se colore en bleu lorsqu'on lui ajoute de la teinture de gaïac ancienne qui est toujours peroxydée, sans qu'il soit besoin d'introduire d'eau oxygénée.

Recherche des peroxydiastases en présence des oxydases

446. — Pour faire cette recherche, on emploie l'appareil décrit § **443**, en plaçant dans le tube A la solution à examiner, et dans le tube B quelques centimètres cubes de solution de gaïacol avec 1 goutte d'eau oxygénée pure. On fait le vide comme il a été indiqué, puis on retourne l'appareil pour mélanger les liquides. S'il y a une peroxydiastase, la coloration rouge apparaît bientôt en l'absence de l'air ; elle correspond, en effet, à un phénomène d'oxydation qui est dû, non pas à l'oxygène de l'air, mais à l'oxygène atomique libéré de l'eau oxygénée.

CHAPITRE XIX

CLASTASES

Préparation de la zymase de levure

447. — On peut obtenir un extrait riche en zymase en faisant macérer pendant quelques heures avec de l'eau de la levure préalablement desséchée dans des conditions déterminées (A. Lebedeff). La méthode ne convient pas avec toutes les races de levure.

Il est facile de préparer le matériel nécessaire à l'expérience.

448. — *Dessiccation de la levure.* On prend de la levure fraîche de brasserie, en pâte claire, et on la délaie dans 4 à 5 parties d'eau froide. On laisse ensuite au repos, en introduisant dans le liquide quelques morceaux de glace, ce qui accélère le dépôt de la levure. On décante l'eau surnageante, on égoutte la levure sur une toile et on l'exprime lentement, d'abord à la main, puis à l'aide d'une presse, jusqu'à ce qu'elle soit devenue blanche et friable.

La masse, tamisée à travers un tamis à larges mailles, est mise à sécher sur des feuilles de papier, dans une

étuve à 35-37°. On attend que la dessiccation soit totale, ce qui demande environ deux jours. Les fragments obtenus sont pulvérisés et la poudre conservée dans un flacon sec.

449. — *Préparation de la macération de levure.* On délaie 100 grammes de levure sèche dans 300 à 350 centimètres cubes d'eau, et on abandonne le mélange pendant 3 à 4 heures à l'étuve à 35-37°, en agitant de temps à autre. La masse est ensuite jetée sur un filtre en papier Chardin. Le liquide opalescent et coloré en jaune contient la zymase [1].

On peut montrer la présence de celle-ci en introduisant 1 gramme de saccharose finement pulvérisé dans 10 centimètres cubes de liquide, placés dans un tube à essai. On retourne deux à trois fois, sans secouer (pour éviter la formation de mousse) afin de dissoudre le sucre, et on abandonne au repos. Après quelques minutes, on voit se dégager de fines bulles de gaz qui prennent naissance au fond et sur les parois du tube. Le dégagement de gaz carbonique augmente peu à peu, et après une demi-heure il se forme une mousse blanche dont la hauteur peut dépasser un centimètre. Le liquide restant limpide, il est manifeste que cette fermentation n'est pas due à des cellules de levure entraînées.

Si après 2 à 3 heures on étend le liquide de 10 parties d'eau et si on distille, les premières portions recueillies contiennent de l'alcool que l'on pourra déceler par les réactions des §§ **493** et suivants.

---

[1] Ce liquide est également très riche en diastases variées, sucrase, catalase, etc.

Préparation d'une solution de catalase animale

450. — *Catalase du tissu adipeux.* On broie au mortier 10 à 15 grammes de graisse crue de porc avec son poids d'eau, pendant deux à trois minutes, puis on filtre. Ce liquide, mélangé de son volume d'eau oxygénée neutralisée, donne un vif dégagement d'oxygène; soumis une minute à l'ébullition, il ne catalyse plus l'eau oxygénée.

451. — *Catalase du foie.* On broie au mortier 100 grammes de foie de veau avec du sable blanc, en quantité suffisante, et on délaie dans 50 à 60 centimètres cubes d'alcool à 96°. On laisse en contact un quart d'heure, puis on presse aussi énergiquement que possible. Le résidu est alors délayé dans 50 centimètres cubes d'eau, exprimé, délayé une seconde fois dans le même volume d'eau et pressé à nouveau. Les deux extraits aqueux réunis sont filtrés sur papier; le liquide jaunâtre obtenu a une très grande activité vis-à-vis de l'eau oxygénée (Sörensen).

Mesure de l'action de la catalase

452. — On mélange dans un matras une quantité déterminée de solution très diluée de catalase du foie (par exemple 100 centimètres cubes de la solution du § **451**, étendue au 1/1000) avec 100 centimètres cubes d'eau oxygénée neutralisée, diluée de manière à correspondre à deux volumes. On abandonne à basse tem-

pérature à la glacière, et on prélève toutes les trente minutes 25 centimètres cubes de liquide, dans lequel on titre l'eau oxygénée. On opère de même avec un témoin obtenu en mélangeant la solution de catalase portée à l'ébullition, puis refroidie, avec son volume de la même eau oxygénée. On pourra ainsi étudier l'action de la catalase en fonction du temps ou comparer l'activité de diverses préparations de catalase.

Titrage de l'eau oxygénée

453. — Lorsque l'on additionne une solution d'eau oxygénée, préalablement acidifiée par l'acide sulfurique, de permanganate de potassium, il y a décomposition et dégagement d'oxygène. La moitié de l'oxygène dégagé provient de l'eau oxygénée, l'autre du permanganate, comme le montre l'équation suivante :

$$5H^2O^2 + 2MnO^4K + 3SO^4H^2 = 2SO^4Mn + SO^4K^2 + 8H^2O + 5O^2,$$

de laquelle on déduit qu'une molécule d'eau oxygénée correspond à 2/5 de molécule de permanganate.

Pour effectuer le titrage, on dilue préalablement l'eau oxygénée de manière à ce qu'elle titre environ un volume d'oxygène ; il suffit en général d'amener à 100 centimètres cubes, dans une fiole jaugée, 10 centimètres cubes de l'eau oxygénée commerciale. On prélève 10 centimètres cubes de cette dilution que l'on verse dans un verre ; on y ajoute 100 centimètres cubes d'eau distillée et 2 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré, puis peu à peu, en remuant sans cesse,

une solution de permanganate de potassium N/10 [1], jusqu'à coloration rose persistante. Chaque centimètre cube de permanganate correspond à $0^{gr},0017$ d'eau oxygénée, ou à $0^{gr},0008$ d'oxygène actif provenant de celle-ci (Denigès).

APPENDICE

Ferment glycolytique du sang

454. — Le sang renferme normalement de petites quantités de sucre (de $0^{gr},5$ à $1^{gr},5$ par litre). Lorsqu'on l'abandonne à lui-même, ce sucre disparaît rapidement, en quelques heures, sous l'action d'un ferment spécial, qui le transforme vraisemblablement en acide lactique (phénomène de la glycolyse).

L'action de ce ferment glycolytique est totalement empêchée par l'addition de fluorure de sodium au sang. On a ainsi un moyen facile d'étudier le phénomène. Il suffit de répartir le sang d'un animal, aussitôt après la saignée, dans deux flacons, dont l'un contient une quantité de fluorure de sodium correspondant à $0^{gr},2\ ^0/_0$

---

[1] La solution décime de permanganate de potassium se prépare en faisant dissoudre $3^{gr},16$ de sel pur dans 200 centimètres cubes d'eau chaude, faisant refroidir et complétant le volume à un litre.

du sang introduit, l'autre renfermant un peu d'oxalate de sodium (0,1 $^0/_0$) destiné seulement à prévenir la coagulation. En dosant le sucre dans les deux flacons après des intervalles déterminés, on voit que la teneur du premier reste constante, celle du second diminuant au fur et à mesure que la glycolyse progresse.

Dosage du sucre dans le sang

455. — Pour doser le sucre du sang, il faut recueillir celui-ci dans un bocal contenant $0^{gr},2$ de fluorure de sodium en poudre fine pour chaque 100 centimètres cubes de sang. On agite pour dissoudre ; on empêche ainsi la glycolyse et la coagulation.

On mesure exactement 25 centimètres cubes de sang au moyen d'une pipette, on les place dans un verre à pied, et on y verse goutte à goutte, en agitant, 125 centimètres cubes d'alcool à 96°. Après 10 minutes de contact, on filtre à la trompe (§ **124**), ou on centrifuge (§ **135**), on détache le résidu, on le délaye dans 25 centimètres cubes d'alcool à 80° et on essore à nouveau. Ce lavage est répété encore une fois ; les liquides alcooliques réunis sont alors distillés dans le vide (§ **149**) jusqu'à ce que leur volume soit d'environ 15 centimètres cubes.

On verse dans une fiole jaugée de 25 centimètres cubes, on lave le ballon avec quelques centimètres cube d'eau que l'on ajoute au contenu de la fiole, puis on verse dans celle-ci, goutte à goutte, la solution de sulfate mercurique (§ **120**) de manière à déféquer le liquide. On agite, on neutralise exactement avec de la soude à 10 $^0/_0$, versée goutte à goutte, puis on complète au

volume de 25 centimètres cubes avec de l'eau distillée et on mélange bien.

Le liquide est filtré sur un petit filtre sec ; la solution incolore est agitée avec une pincée de zinc en poudre, pendant quelques minutes, en observant les précautions décrites § **120**. Lorsque tout le mercure est enlevé, on décante et on prélève exactement 20 centimètres cubes de liquide, sur lequel on dose le glucose par la méthode indiquée § **105** et suivants.

On multiplie le résultat trouvé par 50 pour avoir le sucre en grammes par litre de sang.

CHAPITRE XX

NOTIONS DE TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE

Généralités

456. — Pour étudier les transformations chimiques produites par les microbes, il est nécessaire d'opérer sur des espèces pures et bien caractérisées. On isolera les espèces par les procédés ordinaires usités en bactériologie, et l'on aura soin d'en contrôler la pureté aussi bien par la constance d'aspect des cultures dans les milieux appropriés que par les méthodes de coloration et l'examen microscopique.

Lorsqu'on sera en possession d'une espèce pure, on la fera agir sur la substance dont on veut connaître les transformations, préalablement dissoute dans un milieu aussi bien défini que possible. Ce milieu ne devra pas, en principe, contenir de substances qui puissent gêner la recherche et le dosage des produits dus à l'action du microbe.

D'après ce qui précède, on est conduit, dans l'étude des fermentations, à considérer successivement : la préparation des milieux de culture, l'ensemencement et la séparation des bactéries, les méthodes de colora-

tion, enfin, les caractères particuliers de chaque fermentation.

Il conviendra, dans cette étude, de faire une place à part aux espèces anaérobies, qui exigent une technique particulière.

Milieux de culture

457. — Les milieux de culture peuvent être liquides ou solides. Comme milieux liquides, on emploie des dissolutions contenant de petites quantités de sels minéraux, chlorure de sodium, phosphates, etc., et des substances organiques, sucres, substances protéiques, etc. On emploie beaucoup le bouillon de viande, les décoctions de levure ou de touraillons, additionnés ou non de divers corps nutritifs, glycérine, sucre, peptone, etc.

Habituellement, pour entretenir les cultures, on utilise des tubes à essai ordinaires, contenant 10 à 15 centimètres cubes de milieu liquide. Celui-ci est introduit commodément au moyen d'un entonnoir de 250 à 500 centimètres cubes de capacité, dont la douille porte un tube de caoutchouc de quelques centimètres de longueur, pouvant être obturé au moyen d'une pince de Mohr et muni d'un ajutage de verre étiré. Le tube garni de liquide est ensuite bouché à l'aide d'un tampon d'ouate et stérilisé comme il est indiqué § **459.**

458. — Les milieux solides peuvent être formés en solidifiant les liquides précédents au moyen de gélatine ou de gélose ; par exemple, on y dissout, en chauffant

à l'ébullition, 10 à 15 °/₀ de gélatine ou 1,5 °/₀ de gélose. Le liquide doit être préalablement neutralisé, la propriété gélifiante de ces substances disparaissant par chauffage en milieu trop acide. On peut clarifier le milieu en y introduisant, après refroidissement à 40°, un peu de blanc d'œuf, et portant de nouveau à l'ébullition. Si la coagulation se fait mal, on ajoute goutte à goutte au liquide de l'acide acétique dilué jusqu'à réaction *très légèrement* acide au papier de tournesol. La clarification étant obtenue, on neutralise à nouveau, si cela est nécessaire, ou même on produit une légère alcalinité par addition de quelques gouttes de soude étendue. Le liquide filtré à chaud est réparti rapidement dans des tubes à essai, au moyen du dispositif indiqué ci-dessus ; on bouche à l'ouate et on stérilise.

Lorsque l'on veut donner une grande surface au milieu solide, on n'introduit dans les tubes que 4 à 5 centimètres cubes de ce milieu, puis on les incline presque horizontalement, aussitôt après les avoir retirés de l'autoclave, en ayant soin que le tampon d'ouate ne soit pas mouillé par le liquide, et on les abandonne au refroidissement. On a ainsi des tubes de gélatine ou de gélose dite inclinée.

On peut aussi employer comme milieux solides des substances protéiques (blanc d'œuf, sérum), coagulées par la chaleur, ou des tranches de divers légumes (pomme de terre, carotte, etc.).

Les milieux solides peuvent être protégés contre la dessiccation par l'emploi de capuchons de caoutchouc, stérilisés à part, et placés sur les tubes qui doivent être conservés quelque temps.

La composition des milieux variant avec les espèces

microbiennes, on indiquera à propos de chaque fermentation les formules qu'il convient d'employer.

Stérilisation à l'autoclave

459. — Ces divers milieux, solides ou liquides, sont débarrassés de germes vivants ou, comme on dit, *stérilisés*, par divers moyens. Le chauffage dans la vapeur d'eau sous pression est le procédé le plus général ; une température de 110° maintenue pendant trente minutes, de 115° pendant vingt minutes, ou de 120° pendant quinze minutes, suffit d'ordinaire pour stériliser tous les milieux. Ce chauffage s'effectue dans un autoclave, constitué par une marmite de Papin en bronze, contenant de l'eau. A l'intérieur se trouve un panier en toile métallique dans lequel se placent les objets à stériliser ; l'appareil est muni d'un couvercle auquel sont adaptés un robinet, un manomètre et une soupape de sûreté.

Pour se servir de l'autoclave, verser dans la chaudière une quantité d'eau suffisante pour que le niveau arrive un peu au-dessous du fond du panier métallique ; introduire celui-ci, après y avoir disposé les vases contenant les milieux à stériliser (ces vases sont bouchés avec un tampon d'ouate recouvert d'une double feuille de papier à filtrer assujettie avec une ficelle). On dispose alors le couvercle, et on le fixe à l'aide des écrous, que l'on serre très modérément, à la main, de façon à ne pas écraser l'anneau de caoutchouc interposé. Le robinet de vapeur étant ouvert, on chauffe, puis on attend que l'air soit expulsé par la vapeur d'eau. On reconnaît

que ce résultat est obtenu parfois à la différence des sons que produisent l'air et la vapeur en soufflant par le robinet, mais surtout à l'aspect du jet gazeux. Tant que celui-ci est formé par un mélange d'air et de vapeur, le nuage produit par condensation varie sans cesse d'aspect ; ce nuage prend une opacité constante dès que tout l'air est expulsé. A ce moment on ferme le robinet, et on attend que l'aiguille du manomètre marque la température désirée [1]. Dès que celle-ci est atteinte, il faut la maintenir constante en diminuant convenablement la hauteur de la flamme.

Après un chauffage de durée suffisante (pendant lequel on doit surveiller très fréquemment le manomètre), on éteint le feu et on laisse refroidir. Lorsque l'aiguille du manomètre est revenue au zéro, *et seulement à ce moment*, on ouvre avec précaution le robinet de vapeur, puis on desserre les écrous et on enlève le couvercle.

Préparation et stérilisation des pipettes Pasteur

460. — On coupe, au moyen d'un couteau à verre, des fragments de tubes de verre de 20 à 25 centimètres de longueur. Le diamètre le plus convenable est de 7 à 8 millimètres. On arrondit les extrémités en les flambant au chalumeau, puis, après refroidissement, on introduit aux deux extrémités des tampons d'ouate assez

---

[1] Si, pendant ce temps, il se produit une fuite de vapeur en un point quelconque de la circonférence du couvercle, on l'arrête en resserrant légèrement les écrous correspondants soit à la main, soit à l'aide d'une clé.

serrés, de 2 centimètres environ de longueur, qui ne doivent pas déborder. Cette opération se fait très bien en poussant les tampons avec un morceau de gros fil de fer ou un fragment de baguette de verre effilé. Lorsque les tubes sont garnis d'ouate, on les stérilise en les plaçant dans une étuve à air chaud, en tôle, dans laquelle on les porte à la température de 180° pendant quinze minutes. Si la stérilisation est suffisante, les cotons doivent être légèrement roussis, à peine teintés de jaune clair. Après refroidissement, on conserve les tubes dans cet état.

On peut également stériliser les pipettes en les chauffant à l'autoclave vers 120°, par exemple, mais il faut alors les laisser sécher à l'étuve avant de s'en servir.

Lorsqu'on a besoin de pipettes stériles, on chauffe l'un de ces tubes par le milieu en le tournant sans cesse dans la flamme du chalumeau ; quand le verre est bien ramolli, on retire de la flamme et on étire, de manière à avoir une partie effilée de 40 à 50 centimètres de longueur, pas trop mince. On coupe cette effilure au milieu en la fondant au bord de la flamme, et on a deux pipettes stériles, dont il suffit de briser la pointe après refroidissement, au moment d'en faire usage.

Ensemencement des milieux de culture

461. — Cette opération a pour but de porter une semence dans un milieu de culture stérile, en évitant la contamination par les germes étrangers. On devra donc porter la semence, soit avec une pipette stérile, soit avec un fil de platine préalablement porté au

rouge, puis refroidi, et éviter l'introduction des germes de l'air, en particulier.

Dans ce but, on maintient toujours, autant que possible, les tubes à essai ou les cols des ballons inclinés au moment où on les débouche; on flambe leur ouverture avant de les reboucher pour ne pas y introduire d'impuretés en replaçant le tampon d'ouate ; ce dernier ne doit pas être posé pendant l'opération, mais tenu de manière à éviter tout contact à la partie qui pénètre dans l'intérieur du tube ; enfin, on doit flamber, après l'avoir brisée, l'effilure des pipettes Pasteur destinées à prélever et à transporter la semence. On évite ainsi la contamination par les germes qui auraient pu se déposer sur les effilures.

L'opération doit être faite, de préférence, dans une pièce où l'air est au repos, en faisant le moins possible de mouvements capables de mettre les poussières en suspension.

Une bonne précaution consiste à recouvrir, après l'ensemencement, le coton qui ferme le col des ballons ou l'ouverture des tubes avec un capuchon formé d'un double de papier à filtrer ; ce capuchon peut être assuré au besoin par une ligature.

Séparation et isolement des germes

462. — Cette opération permet d'obtenir des cultures pures des espèces microbiennes que l'on désire étudier. Elle peut être réalisée soit par un procédé mécanique, soit en se basant sur une propriété physiologique de l'espèce étudiée, telle que la résistance à la chaleur, par exemple.

On réalise la séparation mécanique des germes de la manière suivante :

On utilise un fil de platine assez gros, emmanché sur un agitateur, ou bien une simple effilure de verre, obtenue en étirant une baguette à son extrémité. On flambe l'instrument, on le laisse refroidir et on prélève avec son extrémité un peu de mélange à séparer, que l'on porte dans l'intérieur d'un tube de gélose incliné. L'extrémité du fil est appliquée sur la gélose au fond du tube, et on la ramène vers l'ouverture par un mouvement en zigzag de manière à l'essuyer en quelque sorte à la surface du milieu nutritif. On recommence dans un deuxième, puis un troisième tube, *sans reprendre de semence*. Les ouvertures des tubes sont aussitôt flambées, puis bouchées. On débarrasse ainsi peu à peu le fil de platine ou de verre des germes qu'il portait; ceux-ci sont étalés à la surface de la gélose, séparés et disséminés, et, après séjour convenable des tubes à l'étuve à 35°, on trouvera sur la gélose des colonies plus ou moins isolées, produites par le développement des germes. Il suffira de prélever ces colonies à l'aide d'une pipette de verre effilée, et de les ensemencer sur un milieu stérile.

Les colonies auront été au préalable examinées au microscope à un très faible grossissement (objectif 1 ou 2), de manière à ce que l'on puisse reconnaître celles qui appartiennent à une même espèce et qui sont toutes semblables entre elles. On devra se rappeler que des colonies, même très homogènes en apparence, peuvent être formées de deux espèces microbiennes associées; on le reconnaîtra, le plus souvent, à l'examen au microscope.

On peut également se contenter de tremper le fil de platine portant la semence dans l'eau qui se condense toujours au fond des tubes de gélose; on le plonge ainsi successivement sans le recharger dans l'eau de condensation de trois à quatre de ces tubes, en l'agitant bien pour dissocier et délayer les germes; on incline ensuite chaque tube pour faire couler le liquide à la surface de la gélose. Lorsqu'il s'est étalé uniformément, on redresse les tubes et on les place à l'étuve à 35°.

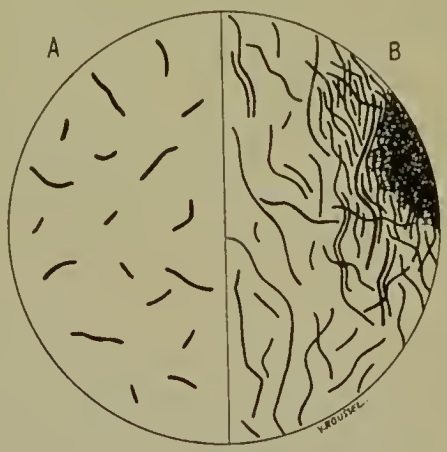


Fig. 43. — Bacillus subtilis.
A. Culture jeune. — B. Bord du voile.

463. — Une deuxième méthode de séparation est celle qui repose sur la résistance à la chaleur d'une espèce donnée ou de ses spores. On peut l'appliquer par exemple à l'isolement du *Bacillus subtilis*.

Les spores de cette espèce, très répandues à la surface du sol et sur les fourrages, résistent à une température de 100° prolongée pendant assez longtemps ;

cette température détruit tous les microorganismes à l'état végétatif. On peut donc obtenir une culture pure de *B. subtilis* en opérant de la manière suivante :

On fait infuser dans une capsule de porcelaine un peu de foin desséché avec une quantité d'eau chaude suffisante pour le recouvrir, pendant une demi-heure. On filtre le liquide dans un matras que l'on bouche avec un tampon d'ouate et on porte à l'ébullition pendant au moins un quart d'heure. On laisse refroidir, puis on porte à l'étuve à 35°; après vingt-quatre à quarante-huit heures, le liquide est couvert d'un voile mince dû à *B. subtilis*. On examinera au microscope, d'une part un fragment du voile, de l'autre, une goutte du liquide renfermant encore de petits bacilles très mobiles souvent fixés bout à bout et donnant des filaments plus ou moins longs (*fig.* 43).

Isolement des anaérobies

464. — On réalise l'isolement des microbes anaérobies le plus commodément par la méthode suivante (Veillon et Zuber).

On prépare d'abord une macération de 250 grammes de viande dégraissée et hachée dans 500 centimètres cubes d'eau. On abandonne deux ou trois jours, puis on passe à travers une mousseline et on ajoute 5 grammes de peptone et 2gr,5 de chlorure de sodium. On chauffe légèrement en agitant, et lorsque la dissolution est obtenue, on introduit 6 grammes de gélose coupée en petits fragments, puis assez de soude à 10 % pour que le liquide bleuisse nettement le papier de tournesol. On chauffe alors à l'autoclave, à 120°, pen-

dant une demi-heure. Le liquide visqueux est refroidi ensuite à 50°, et on y ajoute la moitié d'un blanc d'œuf battu dans un peu d'eau où on a fait dissoudre 7 à 8 grammes de glucose. Le mélange bien remué est porté de nouveau à 120° pendant quinze minutes. Le liquide bouillant, versé sur un filtre en papier Chardin, doit passer rapidement et très clair. On le répartit aussitôt dans des tubes à essai, au moyen du dispositif décrit (§ **457**), de manière à ce que chaque tube soit rempli jusqu'à une hauteur de 10 centimètres environ; on bouche à l'ouate et on stérilise par chauffage de quinze minutes à 115°.

465. — Pour isoler les anaérobies contenus dans le sol, par exemple, on délaie une pincée de terre de jardin dans 10 à 15 centimètres cubes d'eau et on laisse déposer. On plonge d'autre part cinq à six tubes de gélose (préparée comme ci-dessus) dans de l'eau bouillante, de manière à liquéfier complètement la masse, puis on les retire après cinq à dix minutes et on les maintient à 40° dans un bain-marie. Ils restent ainsi à l'état liquide, sans que la température soit mortelle pour les bactéries.

On ensemence ensuite de la manière suivante : on prend une pipette Pasteur à longue effilure, fermée, on s'en sert pour prélever une gouttelette de l'eau de lavage de terre, et on l'enfonce dans le premier tube de gélose fondue, en remuant de manière à bien mélanger. La pipette étant retirée de ce tube, est plongée dans un second, sans être rechargée de semence ; on agite bien, on recommence avec un troisième tube, et ainsi de suite. Toutes ces opérations sont faites avec les précautions d'asepsie habituelles.

On obtient ainsi des tubes de gélose dans lesquels la semence est diluée progressivement et où les microbes sont de plus en plus disséminés et rares. Les tubes ensemencés sont plongés aussitôt dans l'eau froide, de manière à ce que la gélose solidifiée maintienne chaque germe à sa place. Les tubes étiquetés sont alors mis à l'étuve à 35°-37°.

Si les tubes ont été bien purgés d'air par chauffage à 100°, ils contiennent peu d'oxygène ; la pénétration se fait par la surface, lentement, et ne dépasse guère 1 à 2 centimètres. Dans cette zone aérée supérieure pourront se développer des aérobies, tandis que les anaérobies pousseront dans la zone profonde. Les microbes donnent naissance à des colonies que l'on voit apparaître peu à peu sous forme de points d'aspects divers.

Ces colonies, nombreuses dans les premiers tubes, doivent être rares et bien isolées dans les derniers. On peut facilement les examiner aux faibles grossissements du microscope.

Pour les isoler, il faut repérer d'un point à l'encre la colonie que l'on désire, et la prendre avec une pipette à longue effilure que l'on a flambée après en avoir brisé la pointe. Le tube étant placé horizontalement, on pique la pointe dans la gélose, jusqu'à ce qu'elle touche la colonie voulue ; on aspire alors légèrement au moyen d'un tube de caoutchouc fixé à la pipette, et on fait pénétrer dans celle-ci tout ou partie de la colonie. On retire la pipette en évitant de toucher les colonies voisines, et on réensemence dans le milieu choisi en y soufflant légèrement la colonie isolée.

La plupart des espèces anaérobies donnent lieu, sur-

tout en présence du sucre, à un dégagement gazeux qui fragmente et désagège le milieu solide ; on peut empêcher ce dégagement dans la plupart des cas, en ajoutant au milieu de culture 0,1 % de nitrate de potassium.

Fixation et coloration des microbes

466. — Pour observer les bactéries avec leur aspect réel, il est indispensable de les examiner au microscope à l'état vivant; on peut ainsi déterminer leur forme, leurs dimensions, apprécier leur motilité, etc. Cet examen se fait facilement, en déposant sur une lame porte-objet une goutte de culture en milieu liquide, recouvrant d'une lamelle, et portant sur la platine du microscope. Lorsqu'il s'agit d'une culture sur milieu solide, on délaie une parcelle de celle-ci dans une goutte d'eau placée sur la lame, puis on recouvre et on examine. On doit employer, pour l'examen des microbes vivants, un éclairage bien réglé, un excès de lumière pouvant empêcher complètement de les apercevoir.

On obtient aussi de très bons résultats en les observant dans l'éclairage sur fond noir de l'ultramicroscope.

Pour examiner les cultures des espèces anaérobies, on dépose la lamelle avec précaution sur la goutte liquide, en évitant la formation de bulles d'air. On fait tomber sur les quatre angles de la lamelle une goutte de paraffine fondue, et on étale celle-ci avec un fragment de fil de fer recourbé légèrement chauffé, de manière à border la lamelle et à empêcher le contact de l'air avec la préparation.

Les bactéries, d'abord immobilisées, reprennent peu à peu toute la vivacité de leurs mouvements.

467. — Lorsqu'on veut déceler la présence des bactéries dans des tissus ou parmi des fragments de substances inertes, ou apercevoir des détails de structure, il est préférable de procéder à leur coloration. Celle-ci facilite d'ailleurs dans tous les cas la recherche et l'examen des microbes.

On commence par poser sur une lame bien propre (nettoyée au moyen d'un linge fin imbibé d'eau ammoniacale) une goutte, soit de la suspension microbienne à étudier, obtenue par agitation avec de l'eau, soit du milieu de culture, comme pour l'examen à l'état frais ; on étale cette goutte en mince couche sur une surface de 1 à 2 centimètres carrés et on laisse sécher à l'air. Quand la dessiccation est obtenue, on procède à l'opération dite *fixation*, qui a pour but de fixer la forme et la structure des éléments cellulaires, et en même temps les fait adhérer assez étroitement au support pour que les lavages et les traitements ultérieurs ne puissent les en détacher.

Pour fixer, on recouvre la lame de quelques gouttes d'un mélange à parties égales d'alcool à 96° et d'éther ordinaire; on jette ce liquide, on verse à nouveau quelques gouttes du même mélange, puis on laisse sécher à l'air.

Pour colorer, on recouvre ensuite la préparation d'une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène, de fuchsine ou de violet de gentiane; cette solution doit être filtrée au moment de l'emploi. Après quelques instants de contact, on jette l'excès de colorant, on lave

à l'eau et on fait sécher. Si la coloration est insuffisante, on recommence en prolongeant un peu le temps de contact avec la matière colorante.

Double coloration

468. — Dans certains cas, il peut être avantageux de faire une double coloration, par exemple lorsque l'on veut faire apparaître nettement des noyaux ou des spores, ou encore pour différencier des espèces bactériennes dans un mélange. Il ne s'agit pas de reproduire ici les innombrables techniques qui sont utilisées en bactériologie, mais d'indiquer simplement le principe des doubles colorations, au moyen de quelques exemples simples. D'une manière générale, on teinte d'abord l'ensemble de la préparation, fixée au préalable, par un colorant approprié ; on traite ensuite par un agent de différenciation. En plaçant la préparation dans un second colorant, celui-ci ne se fixera que sur les parties précédemment décolorées. On choisit les deux couleurs de manière à avoir un contraste très net : violet et rouge, bleu et rouge, rouge et vert, etc.

469. — Un premier exemple très simple de double coloration est celui des cellules nucléées. On sait que la chromatine des noyaux fixe énergiquement les matières colorantes dites basiques : bleu de méthylène, fuchsine, etc. Si on traite d'abord la préparation par un colorant acide, comme l'éosine, l'ensemble est coloré d'une manière diffuse. En faisant alors agir un colorant basique, celui-ci déplace le premier pour se fixer élec-

tivement sur le noyau de la cellule; la double coloration est ainsi obtenue sans différenciation ni décoloration spéciales.

Les hématies nucléées du sang des oiseaux ou des reptiles se prêtent parfaitement bien à cette technique. On opérera de la manière suivante : un pigeon étant piqué à la grosse veine qui suit le bord de l'aile, on dépose une goutte du sang qui s'écoule sur une lame de verre bien propre ; on étale vivement avec le bord d'une carte de visite, que l'on fait glisser à la surface de la lame, tout en soufflant pour obtenir une dessiccation rapide. La préparation est alors fixée à l'alcool absolu (que l'on renouvelle une à deux fois) pendant cinq à dix minutes. On recouvre ensuite avec une solution aqueuse d'éosine à 0,5 $^0/_0$, pendant une minute environ ; ce colorant est alors jeté et remplacé par la solution aqueuse saturée de bleu de méthylène, dont l'action doit durer à peu près trente secondes. On lave aussitôt à l'eau distillée, tant que celle-ci se colore d'une façon visible, on sèche et on examine au microscope (obj. 5 ou 8, oc. 2). Les hématies sont colorées, le noyau en bleu, le protoplasma en rose.

470. — Nous choisirons comme second exemple celui de la coloration des spores. La spore bactérienne est en général difficile à colorer et, pour y arriver, il est nécessaire de traiter préalablement par un mordant. Lorsque la coloration est obtenue, elle est également très difficile à enlever ; les réactifs décolorants la respecteront et, en traitant par une seconde matière colorante convenable, cette dernière teindra les bactéries; on obtiendra ainsi la double coloration cherchée.

On peut étudier cette coloration sur un fragment de voile de *Bacillus subtilis* de vingt-quatre à quarante-huit heures, qui renferme des bacilles sporulés (§ **463**), ou sur une préparation provenant d'une culture de ferments butyriques du sol âgée de deux à trois jours (§ **486**).

On étale une goutte de culture (ou un fragment de voile, dissocié dans une goutte d'eau) sur une lame, on laisse sécher, et on fixe à l'alcool-éther pendant deux à trois minutes. On dépose sur la préparation quelques gouttes d'une solution d'acide chromique à 5 $^0/_0$ et on laisse agir ce mordant pendant cinq minutes; on lave à l'eau, on verse plusieurs gouttes de solution phéniquée de fuchsine [1], de manière à couvrir complètement la préparation, et on chauffe au-dessus d'une petite flamme jusqu'à émission de vapeurs, pendant cinq à dix minutes, en ajoutant de temps à autre quelques gouttes de colorant, de façon à ce que la préparation ne soit *jamais à sec*. On lave alors à grande eau pour enlever l'excès de couleur, et on différencie en plongeant la lame pendant trente secondes à une minute dans une solution aqueuse de chlorhydrate d'aniline à 2 $^0/_0$. On lave à l'alcool à 96°, qui décolore toute la préparation, à l'exception des spores. On examine au microscope; si la décoloration est incomplète, on traite à nouveau par le chlorhydrate d'aniline et d'alcool.

La lame est alors recouverte de solution aqueuse de

---

[1] Cette solution, dite fuchsine de Ziehl, se prépare en mélangeant 10 centimètres cubes d'une solution à 10 $^0/_0$ de fuchsine dans l'alcool à 96° avec 90 centimètres cubes de solution aqueuse de phénol ordinaire à 1 ou 2 $^0/_0$. On filtre avant l'emploi.

bleu de méthylène, de manière à colorer les bactéries; après environ une minute de contact, on lave à l'eau, on sèche et on examine au microscope. Les microbes apparaissent en bleu, les spores doivent être colorées en rouge vif.

471. — Un dernier exemple est fourni par la méthode de coloration universellement connue sous le nom de méthode de Gram. Lorsque l'on traite par une solution d'iode dans l'iodure de potassium une préparation fixée et colorée (avec un dérivé de la pararosaniline) de certaines bactéries, on observe que cette préparation ne se décolore plus par l'alcool absolu (bactéries prenant le Gram); avec d'autres espèces microbiennes, au contraire, la décoloration peut être obtenue par l'alcool, après traitement à l'iode (microbes ne prenant pas le Gram).

Cette méthode est très employée par les bactériologistes, parce qu'elle leur fournit un élément commode pour différencier les espèces.

Lorsqu'il s'agit d'un mélange d'espèces qui prennent le Gram (levure de bière, *Saccharomyces vini*, *Bacillus subtilis*, etc.) avec des microbes qui ne le prennent pas (ferment acétique, etc.), on peut, après avoir décoloré ces derniers par la méthode de Gram, les teindre à l'aide d'une autre couleur ; on a ainsi une double coloration qui facilite la recherche.

On peut étudier cette méthode sur le mélange de ferment acétique et de *Saccharomyces vini* qui se forme le plus souvent à la surface du vin abandonné à l'air libre.

Pour cela, on délaie un petit fragment du voile con-

tenant ces microbes dans une goutte d'eau déposée sur une lame de verre ; on laisse sécher, on fixe à l'alcool absolu, pendant deux à trois minutes, puis on colore par du violet de gentiane aniliné [1] pendant trois à quatre minutes. On jette l'excès de colorant et, sans laver à l'eau, on couvre la préparation de liquide de Gram (solution contenant 1 gramme d'iode et 2 grammes d'iodure de potassium pour 300 centimètres cubes d'eau) que l'on fait agir environ deux minutes. On lave alors la préparation, qui a pris une teinte brune mordorée, avec de l'alcool absolu, *tant que ce liquide se colore*, on sèche et on examine au microscope. Le *S. vini* est coloré en violet foncé, le ferment acétique n'est pas coloré.

On peut alors teindre ce dernier en rouge en faisant agir sur la préparation la solution aqueuse saturée de fuchsine, pendant vingt à trente secondes ; on lave à l'eau, puis on fait sécher et on examine.

472. — La méthode primitive de Gram a été modifiée par Nicolle de la manière suivante : on emploie pour la coloration une solution phéniquée de violet de

---

(1) Pour obtenir ce colorant, qui doit être préparé extemporanément, on ajoute à 10 centimètres cubes de solution aqueuse saturée d'aniline, un volume de solution alcoolique saturée de violet de gentiane suffisant (1 centimètre cube environ) pour les colorer en violet foncé et opaque : on s'aperçoit que la quantité de colorant est assez grande lorsqu'il se forme à la surface une mince pellicule irisée.

Le violet commercial renferme toujours une certaine quantité de dextrine insoluble dans l'alcool ; la solution alcoolique saturée contient donc un excès de matière non dissoute et doit être filtrée au moment de l'emploi.

gentiane (préparée comme la fuchsine de Ziehl, § **470**), que l'on fait agir quatre à six secondes seulement; on recouvre ensuite de solution iodo-iodurée (à 1 gramme d'iode et 2 grammes d'iodure pour 200 centimètres cubes d'eau) que l'on renouvelle deux à trois fois, et qui doit rester en contact avec la préparation pendant quatre à six secondes; enfin on verse goutte à goutte un mélange de 5 parties d'alcool absolu avec 1 partie d'acétone, tant que ce mélange s'écoule coloré. On lave à l'eau, on sèche et on examine. Le procédé de Nicolle est plus rapide, mais d'une exécution un peu plus délicate que la méthode primitive,

---

CHAPITRE XXI

ÉTUDE DES PRINCIPALES FERMENTATIONS

Fermentation alcoolique

473. — La levure se développe de préférence dans les milieux sucrés contenant des substances minérales et azotées convenables, de réaction neutre ou faiblement acide. Elle fait subir au sucre la fermentation alcoolique, suivant l'équation :

$$C^6H^{12}O^6 = 2CO^2 + 2C^2H^5OH.$$

Le saccharose est d'abord hydrolysé sous l'influence de la sucrase de la levure; il en est de même du maltose sous l'action de la maltase.

L'alcool et le gaz carbonique formés sont accompagnés de petites quantités de glycérine et d'acide succinique.

474. — On prépare pour la levure un milieu de culture sucré avec :

Eau de levure (ou eau de touraillons)..	200^{cm3}
Saccharose.....	20^{gr}

On dissout et on stérilise à l'autoclave à 115° pendant quinze minutes.

L'eau de levure s'obtient en faisant bouillir 1 partie de levure pressée du commerce avec 20 parties d'eau, pendant dix minutes, puis filtrant. Quant à l'eau de touraillons, on la prépare en faisant bouillir pendant un quart d'heure 1 partie de touraillons secs (radicelles d'orge germée, formant le résidu de la fabrication du malt) avec 15 à 20 parties d'eau et filtrant. On obtient plus commodément ce liquide en faisant une dissolution d'extrait de touraillons (que l'on trouve dans le commerce sous le nom de maltopeptone), à raison de 5 à 10 grammes par litre d'eau.

475. — Pour obtenir une levure en culture pure, il suffit d'ensemencer un tel milieu avec le dépôt que l'on trouve au fond d'une bouteille de vin ou de bière récemment vidée. On abandonne à l'étuve à 25°; au bout de trois à quatre jours, le liquide est en pleine fermentation alcoolique. On en prélève alors une goutte qui sert à faire un isolement par stries sur des tubes de gélose inclinée (eau de levure ou eau de touraillons gélosée à 1,5 $^0/_0$).

Les colonies de levure apparaissent sous forme de taches blanches, opaques, arrondies et brillantes, comme des gouttelettes de crème déposées à la surface de la gélose. Il suffit de prélever une de ces colonies et de la repiquer dans un tube d'eau de levure, en prenant toutes les précautions indiquées (§ **461**). On abandonne à l'étuve, à une température d'environ 25°. Il se dégage bientôt du gaz carbonique; au bout de trois à quatre jours, le sucre a presque totalement disparu, et le liquide s'est enrichi en alcool, que l'on peut isoler et doser.

Lorsque l'on fait un isolement en partant des lies de

Fig. 44. — Levure de vin.

vin, on obtient, à côté de colonies formées de levure

Fig. 45. — Saccharomyces apiculatus.

ordinaire (*fig.* 44), des colonies d'aspect analogue, mais

formées de levure apiculée, dont la forme en citron est caractéristique (*fig.* 45).

Fermentation lactique

476. — Les ferments lactiques sont très nombreux et très répandus ; on en trouve notamment en abondance, soit sous forme de bâtonnets, soit sous forme de microcoques souvent réunis en chaînettes, dans les poussières des fourrages et par suite dans les étables où ils contaminent le lait. A une température convenable, 30 à 35°, ils agissent activement sur le lactose, qui est dédoublé, puis transformé en acide lactique :

$$C^6H^{12}O^6 = 2C^3H^6O^3.$$

Le résultat est une forte acidification du lait ; lorsque l'acidité atteint 1 °/₀ environ, il y a coagulation (formation spontanée du caillé).

477. — Pour isoler le ferment lactique ordinaire, on met à l'étuve à 30° un tube à essai contenant 10 centimètres cubes de lait ; lorsque la coagulation s'est produite, on aspire avec une pipette stérile une goutte de liquide, prélevée au-dessous de la couche de crème, et on ensemence un milieu liquide. On emploie de l'eau de touraillons glucosée ou lactosée contenant 5 °/₀ de carbonate de calcium qui, en saturant l'acide lactique formé, favorise le développement de la culture. On prend:

Extrait de touraillons (maltopeptone)..	5^{gr}
Sucre (glucose ou lactose).....	10^{gr}
Carbonate de calcium.....	10^{gr}
Eau.....	200^{cm3}

On stérilise à 115° pendant vingt minutes ; après refroidissement, on ensemence. Il y a bientôt disparition du sucre et formation d'acide lactique, si on maintient à l'étuve à 30-35°. Pour isoler le ferment lactique pur, on fera avec une goutte de culture un isolement par stries sur le milieu précédent solidifié à l'aide de gélose. Le

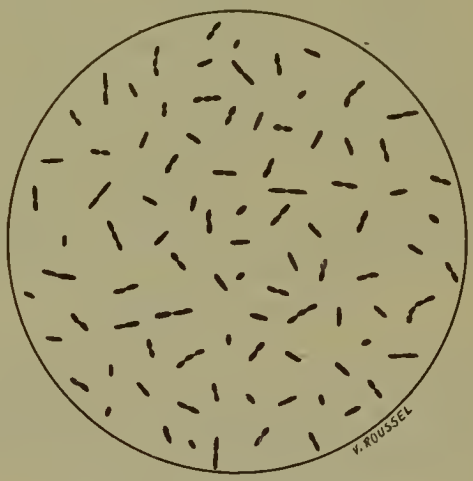


Fig. 46. — Ferment lactique.

ferment lactique donne des colonies transparentes ayant l'aspect d'une gouttelette d'eau. Au microscope, il se présente en très petits articles, généralement groupés par deux ou par trois (*fig.* 46).

Fermentation acétique

478. — Le vin, abandonné à l'air, peut s'acétifier spontanément ; dans ce cas, il apparaît à la surface un voile très mince et très fragile, un peu irisé, et qui, au microscope, se montre formé d'une agglomération de

petits bâtonnets très courts, parallèles les uns aux autres. Dans beaucoup de cas, on observe, au lieu du voile mince du *Mycoderma aceti*, un voile plus épais, d'un blanc mat, plissé à la fin, dû au développement de la fleur de vin (*Saccharomyces vini*). Les cellules de cet organisme sont beaucoup plus grosses que celles

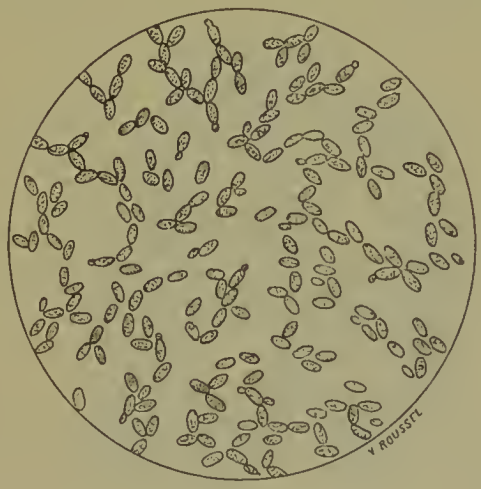


Fig. 47. — Saccharomyces vini.

du ferment acétique ; elles se rapprochent des cellules de levure par leurs dimensions et leur mode de reproduction par bourgeonnement; elles en diffèrent par leur forme beaucoup plus allongée (*fig.* 47). Très souvent la fleur de vin apparaît d'abord, puis le ferment acétique. On voit alors le premier voile disparaître, d'abord par points, puis en totalité, et faire place à celui de *Mycoderma aceti* (*fig.* 48).

Le ferment acétique est le plus souvent apporté par une petite mouche rougeâtre (*Drosophila cellaris*), qui vient se poser sur le liquide alcoolique pour y pondre ses œufs.

479. — Au lieu de vin, on peut utiliser pour l'obtention du ferment acétique le mélange suivant :

Vin (rouge ou blanc).....	1 partie
Eau.....	2 —
Vinaigre de vin [1].....	1 —

Ce liquide est placé dans un cristallisoir, où il oc-

Fig. 48. — Voile de ferment acétique.

cupe une hauteur de 4 à 5 centimètres. On l'abandonne à une température de 28° environ.

480. — Pour produire une fermentation acétique, on prélève une partie du voile, apparu d'emblée ou après la fleur de vin, au moyen d'un agitateur flambé, et on l'ensemence dans un milieu stérile, disposé en couche

---

[1] Le vinaigre renferme fréquemment la bactérie du sorbose ; il est prudent de le chauffer un instant au voisinage de l'ébullition, afin de le stériliser.

mince, dans une fiole conique (50 centimètres cubes de liquide dans une fiole de 250 centimètres cubes de capacité). La culture est placée dans une étuve à 28-29° environ : après un ou deux jours, le voile s'est étendu sur toute la surface. Il fait disparaître rapidement l'alcool, qu'il transforme en acide acétique. On peut s'assurer de cette transformation en dosant comparativement les deux substances, d'après les §§ **183** et **497**.

481. — Le milieu le plus convenable pour la culture du ferment acétique est l'eau de levure additionnée d'alcool. Pour le préparer, on délaie 10 grammes de levure pressée du commerce dans 10 à 20 centimètres cubes d'eau, et on verse la suspension obtenue dans 80 à 90 centimètres cubes d'eau chauffée dans une capsule de porcelaine. On porte à l'ébullition, que l'on maintient pendant cinq minutes, en agitant sans cesse. On filtre alors sur papier Chardin, on laisse refroidir jusqu'à 30 à 40°, et on ajoute un peu de blanc d'œuf ; on mélange bien, puis on porte à l'autoclave à 115° pendant dix minutes. Le liquide filtré, à peu près clair, doit être dilué avec de l'eau, de manière à ne renfermer que $0^{gr},5$ % d'extrait [1]. On ajoute alors 5 % d'alcool, on répartit dans des fioles coniques de 250 centimètres cubes, contenant chacune 50 centimètres cubes de liquide et on stérilise à l'autoclave à 110° pendant vingt minutes. La perte d'alcool pendant ce chauffage est minime.

---

[1] Il suffit, pour connaître la teneur du liquide en extrait, d'en évaporer 10 centimètres cubes à siccité au bain-marie, dans une petite capsule tarée, et de peser de nouveau après dessiccation.

Oxydation de la glycérine par la bactérie du sorbose

482. — La bactérie du sorbose agit sur la glycérine pour la transformer en sucre cétonique, la dioxycétone $CH^2OH\text{-}CO\text{-}CH^2OH$.

Pour obtenir la bactérie du sorbose, on peut abandonner à la température ordinaire, ou dans une étuve chauffée au-dessous de 30°, un mélange à parties égales de vin, d'eau et de vinaigre (ce dernier ne doit pas avoir été chauffé). Après quelques jours, on voit apparaître des taches translucides, légèrement proéminentes, à surface brillante et possédant, lorsqu'elles ont pris un développement notable, l'aspect de gouttes de suif. Ces taches sont des colonies de bactérie du sorbose, apportées dans le liquide soit par le vinaigre, soit par la petite mouche des vinaigreries. Souvent, comme pour le développement spontané du *Mycoderma aceti*, un voile de fleur de vin précède ou accompagne l'apparition de la bactérie.

Pour isoler la bactérie, on prépare de l'eau de levure contenant 0,5 $^0/_0$ d'extrait (voir § **481**) ; on y dissout 2 à 3 $^0/_0$ de glycérine et 1,5 $^0/_0$ de gélose, et on prépare avec ce milieu solidifié des tubes inclinés. On fait un isolement par stries, sur cette gélose glycérinée, au moyen d'une pipette de verre avec laquelle on touche un îlot de bactérie du sorbose.

483. — Lorsqu'on a obtenu une colonie pure du microbe, on s'en sert pour ensemencer de l'eau de levure, contenant 3 $^0/_0$ de glycérine, placée en couche

de 4 à 5 centimètres d'épaisseur dans des matras assez grands et préalablement stérilisée à l'autoclave.

La culture, laissée à l'étuve à 28-29°, se recouvre peu à peu d'une zooglée épaisse, blanchâtre et translucide, formée par un amas de bâtonnets (*fig.* 49). Après

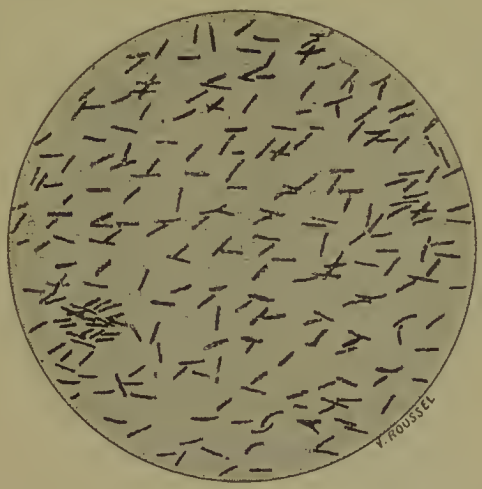


Fig. 49. — Bactérie du sorbose.

quelques jours, le liquide est devenu fortement réducteur, grâce à la présence de la dioxycétone. Celle-ci peut déjà être reconnue par le fait qu'elle réduit presque instantanément, à froid, la liqueur de Fehling.

Fermentation ammoniacale

484. — De nombreuses espèces bactériennes possèdent la propriété de transformer l'urée en carbonate d'ammonium, par hydratation :

$$CO\begin{cases}NH^2\\NH^2\end{cases} + 2H^2O = CO\begin{cases}ONH^4\\ONH^4\end{cases}$$

On peut obtenir une culture impure de ferments de l'urée en abandonnant à l'air, dans un matras à demi-rempli, à une température de 25 à 30°, de l'urine ordinaire. Au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, le liquide s'est troublé et sa réaction est devenue

Fig. 50. — Ferments de l'urée.
A, urobacille ; B, urocoque.

nettement alcaline, par suite de la formation de carbonate d'ammonium ; si la fermentation est suffisamment intense, le liquide dégage une forte odeur ammoniacale.

485. — On peut isoler les ferments en culture pure, en étalant en stries une goutte de la culture sur des tubes de bouillon gélosé (§ **464**) contenant 1 % d'urée.

Il est préférable de faire avec le bouillon de viande (préparé comme au § **464**), un milieu solide en y dissolvant 10 à 12 % de gélatine et 1 % d'urée.

On ensemence sur des tubes de gélatine inclinée.

Lorsque les colonies des ferments de l'urée se développent sur ce milieu, elles s'entourent d'une auréole blanchâtre caractéristique et deviennent faciles à reconnaître. (Cette auréole est due à une précipitation des phosphates alcalino-terreux contenus dans la gélatine sous l'influence de l'ammoniaque formée).

On ensemence ensuite une colonie dans de l'urine stérilisée par chauffage à 110° pendant un quart d'heure. On obtient soit des bacilles souvent réunis entre eux, soit des chaînettes de petits microcoques (*fig.* 50).

On peut suivre facilement les progrès de la fermentation en prélevant de temps à autre 5 centimètres cubes de liquide, dans lequel on dose l'ammoniaque par le procédé indiqué § **533**.

Fermentation butyrique

486. — Il existe dans le sol un grand nombre d'espèces anaérobies capables de provoquer la fermentation butyrique de l'amidon, des sucres, etc. Le glucose, par exemple, subit une décomposition d'après le schéma suivant :

$$C^6H^{12}O^6 = C^4H^8O^2 + 2CO^2 + 2H^2$$

qui rend compte de la formation d'acide butyrique en même temps que du dégagement de gaz carbonique et d'hydrogène.

On peut obtenir avec facilité un bon ferment butyrique en abandonnant quelques tranches de pomme de terre non épluchée dans une éprouvette à pied remplie d'eau et maintenue à l'étuve vers 40°. Au

bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, le liquide est couvert de mousse et dégage une forte odeur d'acide butyrique. On constate en même temps une désagrégation plus ou moins avancée des tranches de pomme de terre.

En prélevant une goutte de liquide et l'examinant

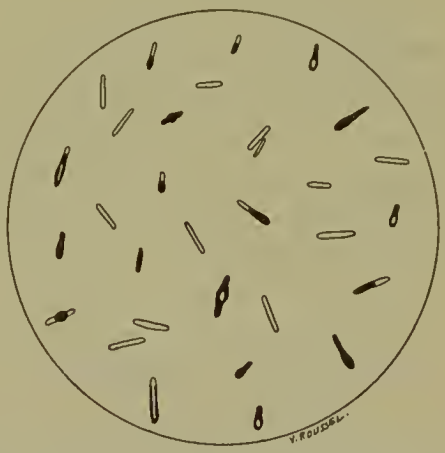


Fig. 51. — Ferment butyrique. Coloration à l'iode.

au microscope sous une large lamelle, on aperçoit des grains d'amidon non attaqués entre lesquels circulent de nombreux microbes en forme de navettes ou de bâtonnets. Les microbes ont des mouvements d'autant moins vifs qu'ils se trouvent plus éloignés du centre de la préparation; sur les bords de la lamelle, au contact de l'oxygène atmosphérique, ils sont tout à fait immobiles.

Si l'on fait pénétrer une goutte d'iodure de potassium iodé sous la lamelle, on voit la plupart des bâtonnets prendre une coloration bleue, ce qui a fait sup-

poser que ces microbes renfermaient de l'amidon (*fig.* 51). Dans les cultures un peu âgées, on n'aperçoit plus que la forme sporulée, non colorable en bleu par l'iode.

487. — Pour obtenir une culture pure de ferment butyrique, on utilisera la méthode de séparation décrite § **465**, et on ensemencera avec une colonie le milieu suivant :

Saccharose.....	6^{gr}
Phosphate d'ammonium.....	$0^{gr},1$ à $0^{gr},2$
Carbonate de calcium.....	5^{gr}
Eau.....	200^{cm3}

On peut déjà obtenir une fermentation butyrique très nette du saccharose en ensemençant la solution ci-dessus avec quelques gouttes de la culture primitive obtenue à l'aide des tranches de pomme de terre. On prendra la précaution d'opérer dans un matras rempli jusqu'au col, pour éviter l'influence de l'oxygène, et de maintenir celui-ci au voisinage de 40°.

488. — Pour recueillir les gaz dégagés au cours de la fermentation, on munit le ballon d'un bouchon portant un tube abducteur dont l'extrémité libre est plongée dans une cuve à eau. Lorsque la fermentation est en pleine activité, on recueille les gaz dans une éprouvette pour les analyser. Comme l'indique l'équation donnée § **486**, ces gaz sont formés d'acide carbonique et d'hydrogène ; on le constate de la manière suivante : on fait passer dans l'éprouvette une pastille de potasse, on bouche avec le doigt et on agite ; l'acide carbonique est absorbé et, en débouchant de temps à autre sur la

cuve à eau, on voit le liquide monter dans l'éprouvette. Quand l'absorption cesse de se produire, on bouche de nouveau, on retourne l'éprouvette, l'ouverture en haut, on l'approche d'une flamme et on débouche vivement ; l'hydrogène s'enflamme et brûle avec une flamme pâle.

Le liquide renferme un mélange d'acides volatils, parmi lesquels prédomine l'acide butyrique ; on pourra le reconnaître et le doser par la méthode de Duclaux (§ **521**).

APPENDICE

SÉPARATION DES ACTIONS DIASTASIQUES ET DES ACTIONS MICROBIENNES

Filtration à la bougie

489. — Dans les fermentations étudiées antérieurement, on ne s'est pas préoccupé du mécanisme des réactions observées. Les transformations chimiques des substances introduites dans les milieux de culture peuvent être dues soit à des diastases, soit à l'action directe du protoplasma vivant ; souvent une décomposition résultera de l'influence successive d'une ou plusieurs diastases, pouvant être suivie d'une action protoplasmique. Pour séparer ces deux phénomènes,

on aura recours à un procédé mécanique tel que la centrifugation ou la filtration, qui fournira un liquide actif si l'activité est due à une diastase, inactif dans le cas contraire.

Il y a des cas où la diastase est si intimement liée au protoplasma qu'il faut recourir à un broyage préalable des cellules avant de filtrer ou de centrifuger.

La méthode la plus généralement employée pour séparer les diastases des microbes qui les produisent est la filtration, à travers la bougie de porcelaine. On emploie la filtration non seulement dans le but qui vient d'être indiqué, mais encore lorsque l'on veut faire agir les diastases dans des conditions rigoureuses d'asepsie, de manière à se mettre à l'abri des causes d'erreur provenant de l'ingérence des bactéries.

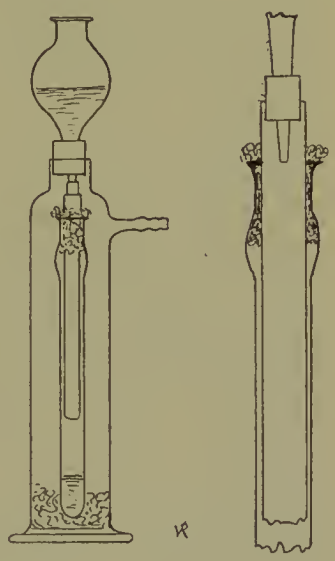


Fig. 52. — Filtration à la bougie.

490. — La technique de la filtration est très simple. On commence par vérifier que la bougie ne présente aucune solution de continuité. Pour cela, on la plonge, l'extrémité fermée en bas, dans une éprouvette pleine d'eau, et on y insuffle de l'air, avec une légère pression, au moyen d'une soufflerie. S'il se produit un dégagement de bulles gazeuses en un point quelconque, la bougie est fissurée et doit être rejetée. Dans le cas

contraire, on l'ajuste au moyen d'un tampon d'ouate serré dans le manchon de verre de l'appareil figuré ci-contre (*fig.* 52), dans lequel on a versé quelques centimètres cubes d'eau; on y adapte l'entonnoir au moyen d'un petit bouchon de caoutchouc, puis on mouille l'intérieur de l'appareil avec un peu d'eau. On bouche l'orifice de l'entonnoir avec un tampon d'ouate, et on stérilise à l'autoclave à 115° pendant quinze à vingt minutes.

La stérilisation ne peut être efficace que si l'appareil est rempli de vapeur d'eau ; lorsqu'on le retire de l'autoclave, on doit s'assurer qu'il reste un peu d'eau condensée à l'intérieur du manchon.

On dispose alors le tout dans l'éprouvette à pied tubulée, au fond de laquelle est placé un peu d'ouate, en ajustant bien le bouchon de caoutchouc supérieur. Le liquide à stériliser étant versé dans l'entonnoir, on fait le vide par la tubulure latérale de l'éprouvette ; le liquide filtre à travers la bougie et se rassemble dans le manchon.

Quand la filtration est terminée, on peut prélever ce liquide au moyen d'une pipette stérile, en prenant toutes les précautions d'asepsie convenables.

491. — On peut appliquer ce procédé à l'étude des diastases de l'*Aspergillus niger*.

Lorsque ce champignon a terminé son développement sur le milieu de Raulin, après trois à quatre jours environ, on fait écouler le liquide épuisé qu'il surnage et on le remplace par de l'eau distillée. On recommence cette opération deux à trois fois, de manière à bien laver la face intérieure du mycélium, et

finalement on laisse ce dernier flotter sur une nouvelle quantité d'eau distillée. On replace la culture à l'étuve à 35-37° et on l'y abandonne pendant vingt-quatre heures.

Après ce temps, on peut constater que le liquide de macération présente une très grande activité diastasique vis-à-vis du saccharose (Gayon). Il contient également, à côté de la sucrase, de la maltase, de l'émulsine, de l'amylase, des ferments protéolytiques, etc.; mais ces diverses diastases ne manifestent leur action qu'au bout d'un temps assez considérable, par suite de leur faible activité. Il convient donc de les étudier dans des conditions aseptiques ; pour cela, on préparera des solutions stérilisées de maltose, de divers glucosides, etc., sur lesquelles on fera agir la macération d'*Aspergillus* filtrée à la bougie, comme il a été indiqué ci-dessus.

Il est important de remarquer que si la macération est acide, les diastases sont fortement retenues par la bougie. Il est donc bon de neutraliser le liquide avant la filtration.

CHAPITRE XXII

RECHERCHE ET DOSAGE DES PRINCIPAUX PRODUITS DE FERMENTATION

Recherche de l'alcool

492. — Il se produit de petites quantités d'alcool dans beaucoup de fermentations autres que la fermentation alcoolique.

Pour rechercher ce corps, on introduit dans un ballon le liquide à examiner, ou la substance solide préalablement divisée et additionnée d'eau ; on neutralise, puis on distille, en se servant d'un refrigérant en verre (de préférence l'appareil de Schlœsing), de manière à recueillir environ 1/10 du liquide, qui renfermera tout l'alcool. On observera avec soin, au commencement de la distillation, l'endroit du réfrigérant où se condensent les vapeurs; s'il y a de l'alcool, même à l'état de traces, on voit se produire des gouttelettes et des stries d'aspect oléagineux. Ce phénomène n'est pas caractéristique de la présence de l'alcool, mais d'un liquide volatil mélangé à la vapeur d'eau.

Si on dispose d'une quantité suffisante de liquide distillé, on peut recommencer une seconde fois la con-

centration, de manière à rassembler la totalité de l'alcool dans le volume de liquide le plus petit possible.

493. — Pour caractériser l'alcool, on prélève dans un tube à essai 1 centimètre cube, par exemple, du liquide obtenu, on ajoute une goutte de chlorure de benzoyle et, peu à peu, en agitant vivement, quelques gouttes de soude à 10 $^0/_0$. Lorsque les gouttelettes du réactif ont disparu, on bouche le tube avec le pouce, on l'agite de manière à en bien mouiller les parois, et on perçoit alors l'odeur aromatique du benzoate d'éthyle. Une solution d'alcool au 1/100 donne très nettement la réaction.

494. — A une autre portion du liquide, d'environ 1 centimètre cube, on ajoute 3 centimètres cubes d'acide nitrique concentré tenant en dissolution 0,5 $^0/_0$ de bichromate de potassium. Il se produit à froid, en quelques minutes, une coloration bleu violet, si le liquide contient un corps à fonction alcool. Cette réaction est également donnée par les aldéhydes, mais non par l'acétone (H. Agulhon).

495. — On ajoute à 2 centimètres cubes de liquide, placés dans un tube à essai, 1 à 2 gouttes de lessive de soude et on chauffe doucement, jusque vers 45 à 50°. On verse alors, goutte à goutte, en agitant, de l'iode en solution à 1 $^0/_0$ (§ **132**) jusqu'à ce que le liquide soit nettement coloré en jaune. On laisse refroidir très lentement, on prélève avec une pipette une goutte du dépôt jaune qui s'est formé, et on examine celui-ci au microscope. Si le dépôt renferme des cristaux jaunes d'iodoforme,

reconnaissables à leur symétrie hexagonale (*fig.* 53), on peut supposer la présence d'alcool.

Il ne faut pas oublier que beaucoup d'autres substances, comme l'aldéhyde et l'acétone ordinaires, fournissent de l'iodoforme dans ces conditions. On distinguera l'aldéhyde à ce qu'il réduit le nitrate d'argent ammoniacal, et l'acétone parce qu'elle ne fait pas virer

Fig. 53. — Iodoforme.

au bleu le réactif acide nitrique-bichromate de potassium.

496. — Lorsque la proportion d'alcool contenue dans la partie distillée n'est pas trop petite, on peut en déterminer la séparation en saturant le liquide de carbonate de potassium sec et pulvérisé. L'alcool vient surnager; il peut être décanté avec une pipette et être reconnu à son odeur, son inflammabilité et à ses autres caractères physiques et chimiques.

Dosage de petites quantités d'alcool

497. — L'alcool est d'abord séparé et concentré à l'état de solution aqueuse, par distillation fractionnée, comme il est indiqué § **492**, mais en tenant compte très exactement du rapport entre le volume soumis au dosage et le volume recueilli.

On peut alors le doser soit par une méthode physique, soit par une méthode chimique.

498. — *Méthode physique : compte-gouttes.* Les mélanges d'eau et d'alcool ont des tensions superficielles plus faibles que l'eau pure. Si on les fait couler par gouttes, sous un volume donné, à travers un orifice de dimensions constantes, le nombre des gouttes correspondant à chacun de ces mélanges est constant et, en outre, d'autant plus grand que la proportion d'alcool est plus forte. On a donc là un moyen de déterminer cette proportion.

L'instrument imaginé par Duclaux est un compte-gouttes, d'une capacité de 5 centimètres cubes entre le trait de jauge supérieur et l'extrémité de l'ajutage cylindrique inférieur. Ce dernier est formé d'un tube capillaire dont le diamètre est tel que les gouttes se succèdent à la vitesse de une par seconde à peu près; l'appareil est construit de telle sorte que, rempli d'eau distillée, à la température de 15°, il donne exactement 100 gouttes (chaque instrument doit être vérifié à ce point de vue).

499. — Quand on veut doser de faibles quantités

d'alcool dans une solution aqueuse, on remplit la pipette jusqu'au trait d'affleurement supérieur par aspiration, puis on nettoie et on essuie soigneusement, avec du papier Joseph, l'extrémité rodée de l'ajutage, qui doit être maintenue bien propre et surtout ne jamais être grasse. Le liquide est maintenu dans la pipette, pendant cette opération, grâce à la fermeture de l'orifice supérieur au moyen de l'index que l'on y appuie. On dispose alors le compte-gouttes bien verticalement sur un flacon, à l'aide d'un bouchon de liège convenablement tailté, puis on enlève le doigt et on compte avec soin les gouttes qui s'écoulent dans le flacon (*fig.* 54). On détermine en même temps la température. Si à la fin de l'opération une gouttelette reste adhérente à l'extrémité de l'ajutage, on la compte pour une demi-goutte.

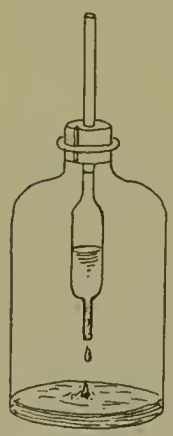


Fig. 54. Compte-gouttes.

Voici les titres alcooliques correspondant aux divers nombres de gouttes à plusieurs températures :

	12°,5	15°	17°,5	20°	22°,5
Eau distillée.	99,5	100	100,5	101	102
Alcool à 0,25	101,5	102	102,5	103	104
— 0,50	103,5	104	104,5	105	106
— 0,75	105	105,5	106	106,5	107,5
— 1	106,5	107	107,5	108	109
— 2	112,5	113	113,5	114,5	115,5
— 3	117,5	118	118,5	119,5	120,5
— 4	122	122,5	123,5	124,5	125,5
— 5	125,5	126,5	127,5	128,5	130
— 6	129,5	130,5	131,5	132,5	134

	12°,5	15°	17°,5	20°	22°,5
Alcool à 7	133	134	135,5	136,5	138
— 8	136,5	137,5	139	140	141,5
— 9	139,5	140,5	142	143	144,5
— 10 %	142,5	144	145	146,5	147,5

500. — *Méthode chimique.* Le dosage de l'alcool dans les solutions très étendues peut se faire en tenant compte des faits suivants. Si on verse dans un tube à essai 1 centimètre cube de solution de bichromate de potassium à 2 % et 5 centimètres cubes d'une solution d'alcool à 0,1 %, puis 5 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré et qu'on fasse bouillir pendant une minute, on voit qu'après refroidissement le liquide est vert pur. On peut, dans une série de tubes à essai, verser successivement 5^{cm3}, $4^{cm3},5$; 4^{cm3}; $3^{cm3},5$; 3^{cm3}; $2^{cm3},5$; $1^{cm3},5$; 1^{cm3}, et $0^{cm3},5$ de la solution alcoolique à 0,1 %; on ajoute assez d'eau pour amener le volume à 5 centimètres cubes, puis on verse 1 centimètre cube de solution de bichromate, 5 centimètres cubes d'acide sulfurique, et on fait bouillir; on prépare de même un témoin sans alcool. Après refroidissement, on a une gamme de teintes allant du vert au jaune, que l'on peut conserver assez longtemps si on évite la chute des poussières, en recouvrant les tubes d'un capuchon de papier. On aperçoit très bien la différence d'un tube au tube voisin, et on peut même, avec un peu d'habitude, intercaler par comparaison un tube de teinte intermédiaire entre deux autres de la série.

501. — Ceci posé, voici comment on opère pour le dosage. Ayant préparé la gamme décrite ci-dessus qui

sert de témoin, on prend une quantité déterminée de liquide à doser, par exemple 5 centimètres cubes, on ajoute 1 centimètre cube de bichromate et 5 centimètres cubes d'acide sulfurique, on fait bouillir, etc., et on compare la teinte. Si elle est intermédiaire entre celle des deux tubes extrêmes, on a aussitôt la richesse en alcool. Si on tombe sur la teinte verte, le liquide est au moins à 0,1 $^0/_0$ d'alcool, et on doit en prendre un volume moindre que l'on amène à 5 centimètres cubes avec de l'eau ; on recommence l'essai jusqu'à ce que l'on ait une teinte convenable, pouvant être comparée à celles de la série. Le dosage peut être fait sûrement ainsi à 1/10 près, à 1/20 près avec un peu d'habitude.

Dosage de l'alcool dans le vin

502. — Pour effectuer le dosage de l'alcool contenu dans un liquide de fermentation, tel que vin, bière, cidre, etc., on le sépare d'abord à l'aide d'une distillation [1].

Le liquide recueilli est additionné d'eau distillée jusqu'à ce que son volume soit égal à celui du liquide primitif ; on a alors un mélange d'eau et d'alcool de même richesse que ce dernier liquide, et il est facile de connaître sa teneur en alcool au moyen d'un densimètre spécial, qui est l'alcoomètre centésimal de Gay-Lussac.

---

[1] Lorsqu'on opère avec un liquide mousseux, la bière par exemple, on commence par l'agiter dans un vase rempli à moitié, pour chasser l'acide carbonique, puis on distille très lentement au début. On peut, en outre, ajouter quelques gouttes d'huile au liquide.

Il importe, dans cette méthode, d'éviter les causes d'erreur qui peuvent fausser la densité.

503. — On commence par mesurer un volume de vin déterminé (environ 50 centimètres cubes) en remplissant jusqu'au trait supérieur l'éprouvette à pied de l'appareil Salleron. On prend la température du vin, qui doit être aussi voisine que possible de 15°, puis on verse celui-ci dans un ballon de 250 centimètres cubes, et on alcalinise légèrement avec une solution étendue de soude, en se servant d'un papier de tournesol comme indicateur. On adapte le ballon au réfrigérant (dans lequel on fait couler l'eau) et on distille. Le liquide est recueilli dans l'éprouvette à pied qui a servi à la mesure, au moyen d'un tube plongeant presque jusqu'au fond, de manière à éviter les pertes par évaporation. En été, il peut être bon de refroidir l'éprouvette en la maintenant dans l'eau glacée.

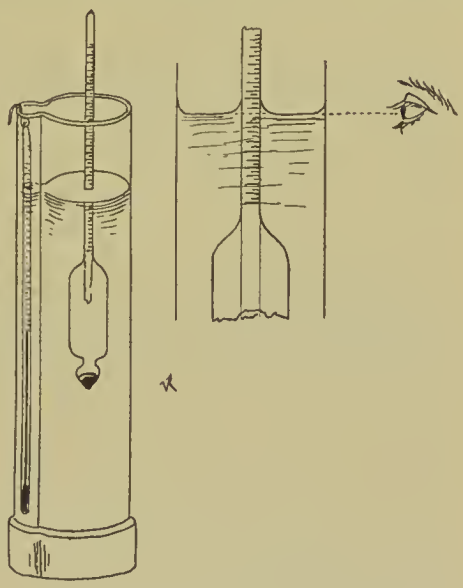


Fig. 55. — Alcoomètre.
Lecture du degré alcoolique.

Lorsqu'on a recueilli environ les deux tiers du volume distillé, on peut être assuré que tout l'alcool a passé à la distillation. On arrête celle-ci et on complète le volume jusqu'au trait supérieur de l'éprouvette. On

emploie pour cela de l'eau froide ou de l'eau tiède, selon le cas, de manière à ce que la température du mélange d'eau et d'alcool soit identique à celle à laquelle on a mesuré le vin. On mélange bien, puis on dispose le thermomètre dans la rainure de l'éprouvette en l'accrochant au rebord supérieur de celle-ci.

TEMPÉRATURE	DEGRÉ LU SUR L'ALCOOMÈTRE													
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°
10	1,4	2,4	3,4	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,6	11,7	12,7	13,8	14,9
11	1,3	2,4	3,4	4,4	5,4	6,4	7,4	8,4	9,4	10,5	11,6	12,6	13,6	14,7
12	1,2	2,3	3,3	4,3	5,3	6,3	7,3	8,3	9,3	10,4	11,5	12,5	13,5	14,6
13	1,2	2,2	3,2	4,2	5,2	6,2	7,2	8,2	9,2	10,3	11,4	12,4	13,4	14,4
14	1,1	2,1	3,1	4,1	5,1	6,1	7,1	8,1	9,1	10,2	11,2	12,2	13,2	14,2
16	0,9	1,9	2,9	3,9	4,9	5,9	6,9	7,9	8,9	9,9	10,9	11,9	12,9	13,9
17	0,8	1,8	2,8	3,8	4,8	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10,8	11,7	12,7	13,7
18	0,7	1,7	2,7	3,7	4,7	5,7	6,7	7,7	8,7	9,7	10,7	11,6	12,5	13,5
19	0,6	1,6	2,6	3,6	4,6	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5	11,4	12,4	13,3
20	0,5	1,5	2,4	3,4	4,4	5,4	6,4	7,3	8,3	9,3	10,3	11,2	12,2	13,1
21	0,4	1,4	2,3	3,3	4,3	5,2	6,2	7,1	8,1	9,1	10,1	11,0	11,9	12,8
22	0,3	1,3	2,2	3,2	4,1	5,1	6,1	7,0	7,9	8,9	9,9	10,8	11,7	12,6

L'alcoomètre doit être bien propre ; la tige graduée, essuyée préalablement avec un linge fin ou même du papier de soie mouillé d'eau ammoniacale, pour enlever les matières grasses, ne doit pas être touchée avec les doigts, si ce n'est à l'extrémité, au-dessus de la graduation. Pour prendre le titre alcoométrique, on descend peu à peu l'alcoomètre dans le liquide, et on l'abandonne au moment où il est presque en équilibre. Si on l'enfonçait trop brusquement, la partie émergeante de la tige, après avoir été mouillée de liquide,

alourdirait l'instrument, et celui-ci donnerait une indication trop élevée.

Lorsque l'équilibre est atteint, on lit la graduation, non au sommet du ménisque, mais en plaçant l'œil très peu au-dessous de la surface du liquide et en visant la ligne où cette surface coupe la tige de l'instrument (*fig.* 55). On note en même temps la température donnée par le thermomètre et on fait la correction au moyen de la table ci-jointe. On voit que la correction est additive pour les températures au-dessous de 15°, soustractive pour celles qui sont au-dessus.

Lorsqu'on dispose seulement d'un alcoomètre gradué de 0° à 10°, on opère avec du vin préalablement dilué de son volume d'eau, si le degré alcoolique est égal ou supérieur à 10.

Recherche de l'aldéhyde

504. — L'aldéhyde éthylique se produit dans diverses fermentations, soit sous l'action directe des micro-organismes, soit par oxydation de l'alcool au contact de l'oxygène de l'air.

Pour rechercher cet aldéhyde, on distille le produit fermenté, préalablement neutralisé si sa réaction est alcaline. On essaie ensuite le liquide distillé avec le nitrate d'argent ammoniacal ou le réactif de Nessler, qui sont rapidement réduits par l'aldéhyde, et avec le bichromate de potassium en solution à 0,5 $^0/_0$ dans l'acide nitrique, dont la teinte jaune passe au bleu violacé, à froid, en présence d'aldéhyde.

Traité suivant les indications du § **495**, le liquide distillé doit donner la réaction de l'iodoforme.

Dosage de l'aldéhyde

505. — On peut doser l'aldéhyde contenu dans une solution en utilisant sa propriété de se combiner avec les bisulfites alcalins. On opère avec un excès de bisulfite ; en titrant l'anhydride sulfureux avant et après action de l'aldéhyde, au moyen d'une solution décime d'iode, on en déduira la richesse en aldéhyde.

Après distillation, on ajoute à 100 centimètres cubes de la solution à titrer, mesurés exactement à l'aide d'une fiole jaugée, une quantité connue, et en excès, de solution de bisulfite de potassium à peu près décinormale [1] ; on prend, par exemple, 20 centimètres cubes de celle-ci. On agite, dans un flacon de 250 centimètres cubes bouché à l'émeri, et on laisse en contact pendant un quart d'heure, en secouant de temps en temps. On verse alors la solution décinormale d'iode (voir § **361**) jusqu'à ce que le liquide se colore en jaune pâle persistant après agitation, et on note le volume employé.

On répète l'opération, en prenant 100 centimètres cubes d'eau distillée et 20 centimètres cubes de bisulfite ; la différence entre les volumes d'iode décime employés représente la quantité correspondant à l'aldéhyde.

En vertu de la réaction :

$$SO^3KH + I^2 + H^2O = SO^4KH + 2HI$$

---

[1] On utilisera une solution de métabisulfite de potassium cristallisé, de formule $S^2O^5K^2$ à 6 grammes par litre.

on voit que chaque centimètre cube d'iode décime correspond à $0^{cm3},5$ de bisulfite décime ou à $0^{cm3},5$ d'aldéhyde décime, soit à $0^{gr},0022$ d'aldéhyde.

Recherche de l'acétone

506. — L'acétone prend naissance dans un certain nombre de fermentations microbiennes. Si on veut caractériser sa présence en petite quantité dans un liquide, on commence par distiller celui-ci dans un appareil d'Aubin, de manière à concentrer l'acétone dans les premières portions. On renouvelle au besoin cette opération. On soumet alors le liquide aux réactions suivantes.

507. — On verse 10 centimètres cubes de liquide dans un tube à essai, on ajoute une goutte d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 10 $^0/_0$, une goutte de soude à 5 $^0/_0$, deux gouttes de pyridine et 1 à 2 centimètres cubes d'éther. Le mélange est oxydé ensuite par l'eau de brome, versée goutte à goutte jusqu'à coloration jaune de l'éther. A ce moment la coloration jaune passe au bleu pâle, soit simplement par agitation à l'air, soit par addition d'une goutte d'eau oxygénée.

508. — On peut également caractériser l'acétone par la formation de *p*-nitrophénylhydrazone. Pour cela, on ajoute à 1 centimètre cube du liquide distillé 4 à 5 centimètres cubes d'alcool à 96°, puis on sature le mélange de *p*-nitrophénylhydrazine à la température ordinaire. La solution obtenue, additionnée de cinq

fois son volume d'eau distillée, précipite des cristaux jaunes, que l'on peut recueillir sur un filtre et sécher. On les redissout ensuite dans l'alcool à 96°, on précipite à nouveau par 5 volumes d'eau, on filtre et on sèche. Les cristaux ainsi purifiés fondent à 148°, au bloc Maquenne ; traités par une solution alcoolique de potasse, ils se colorent en rouge orangé.

509. — L'acétone en solution très étendue, chauffée avec le réactif de Denigès (§ **180**), donne un précipité blanc, très dense, qui est une combinaison mercurique de formule :

$$[(SO^4Hg)^2,3HgO]^3 + 4\ CH^3\text{-}CO\text{-}CH^3.$$

Cette réaction est donnée par tous les corps à fonction cétonique.

510. — Le liquide, traité comme il a été indiqué au § **495**, donne la réaction de l'iodoforme, comme l'alcool et l'aldéhyde.

Il se distingue de ces corps en ce que, additionné d'acide nitrique contenant 0,5 $^0/_0$ de bichromate de potassium, il ne modifie pas la teinte jaune orangé du réactif.

511. — *Recherche de l'acétone dans l'urine.* Certaines urines pathologiques renferment de l'acétone en quantité variable. On peut la rechercher directement dans l'urine de la manière suivante.

Dans 5 centimètres cubes d'urine filtrée, placés dans un tube à essai, on fait tomber un petit cristal de nitroprussiate de sodium (gros comme deux têtes

d'épingle), on agite pour dissoudre, et on verse deux à trois gouttes de lessive de soude. Il se produit une coloration rouge (réaction de Legal, donnée par la créatinine urinaire aussi bien que par l'acétone). Si on ajoute maintenant assez d'acide acétique pour rendre le liquide franchement acide, la couleur passe au rouge violacé s'il y a de l'acétone ; il y a décoloration dans le cas contraire.

Dosage de l'acétone

512. — Le dosage de l'acétone repose sur sa transformation en iodoforme en présence d'une quantité connue d'iode en excès. On titre cet excès lorsque la réaction est terminée, et on en déduit la quantité fixée.

On distille d'abord 100 centimètres cubes de la solution à étudier, acidulée légèrement par addition de $0^{cm3},5$ d'acide acétique, et on recueille le liquide distillé dans un flacon à large ouverture bouché à l'émeri, d'environ 500 centimètres cubes de capacité, refroidi avec de l'eau glacée. Lorsque l'on a environ 80 centimètres cubes de liquide, on interrompt la distillation et on verse dans le flacon 30 centimètres cubes de lessive de soude, puis de l'iode décinormal, au moyen d'une burette, jusqu'à ce que l'iode soit en excès. On reconnaît que l'on est arrivé à ce point lorsqu'une goutte d'acide chlorhydrique, tombant dans le liquide maintenu en mouvement, produit une coloration brune.

On note soigneusement le volume d'iode employé. Après cinq à six minutes, pendant lesquelles on agite fréquemment, la réaction est terminée et l'iodoforme

s'est déposé au fond du flacon. On acidifie en versant de l'acide chlorhydrique étendu de son volume d'eau, en présence d'un fragment de papier de tournesol, et on titre l'iode en excès avec de l'hyposulfite de sodium décinormal, employé jusqu'à disparition de la teinte jaune du liquide. Le volume nécessaire, déduit du volume total d'iode versé, donne la quantité d'iode utilisée pour la transformation de l'acétone en iodoforme. Chaque centimètre cube de solution décime d'iode correspond à $0^{mgr},967$ d'acétone.

Recherche de l'acétylméthylcarbinol

513. — L'acétylméthylcarbinol, dont la formule est $CH^3 — CO — CHOH — CH^3$, se produit en petites quantités dans un certain nombre de fermentations [1].

Pour le rechercher, on distille le liquide de culture, préalablement neutralisé, et on ajoute à quelques centimètres cubes du liquide distillé un peu de liqueur de Fehling, en quantité suffisante pour le colorer en bleu clair. Après quelques instants, *à la température ordinaire*, il y a réduction et dépôt d'oxyde cuivreux.

514. — Pour vérifier que ce caractère est bien dû à la présence d'acétylméthylcarbinol, on ajoute à une partie du liquide distillé 1/10 de son volume de solution d'acétate de phénylhydrazine (voir § **91**), et on

---

[1] L'acétylméthylcarbinol est souvent accompagné de petites quantités de 2.3. butylène-glycol CH^3-CHOH-CHOH-CH^3 ; ce dernier n'est pas réducteur.

chauffe sur le bain-marie bouillant pendant trente à quarante minutes. Il se forme une osazone cristallisée en aiguilles jaune clair. Après refroidissement, on filtre et on lave les cristaux à l'eau froide.

515. — Si on place dans un tube à essai une petite quantité de ces cristaux avec 5 centimètres cubes d'alcool et un égal volume d'éther, on voit, par addition ménagée de chlorure ferrique, le liquide se colorer en rouge foncé. En ajoutant à la solution un volume d'eau, l'éther se sépare coloré en rouge. On le décante et on l'évapore dans une petite capsule ; il laisse un dépôt formé par de longues aiguilles rouge foncé, insolubles dans l'eau, et fondant à 151°.

516. — On peut aussi utiliser l'essai suivant. On mélange dans un tube à essai 3 centimètres cubes de solution de peptone de Witte à 1 $^0/_0$ avec un volume égal de soude à 10 $^0/_0$, et on fait couler doucement à la surface 2 à 3 centimètres cubes du liquide distillé. Il se fait à la surface de séparation un anneau coloré en rouge (Voges et Proskauer).

Recherche et extraction de l'acide lactique

517. — L'acide lactique se produit en proportion variable dans un grand nombre de fermentations.

Pour l'extraire d'un liquide de culture, on chauffe celui-ci au bain-marie, puis on l'additionne d'acide oxalique, en quantité aussi exacte que possible, pour précipiter le calcium dissous. On filtre, on lave le précipité et on concentre le liquide à consistance de sirop

Celui-ci, fortement acide, est épuisé par une demi-douzaine d'agitations avec de l'éther saturé d'eau. On prend chaque fois 4 à 5 volumes d'éther pour un de sirop. Le liquide éthéré est filtré, puis distillé; l'acide lactique, lorsqu'il est présent, se trouve dans le résidu sirupeux; on peut l'y caractériser par les réactions habituelles (§ **170** et suiv.).

518. — Pour isoler l'acide lactique à l'état de sel de zinc, on redissout le résidu de la distillation dans l'eau et on l'additionne de baryte en léger excès. Après quelque temps de repos (nécessaire pour la transformation de l'éther lactyl-lactique, § **185**), on sature l'excès de baryte par le gaz carbonique, on fait bouillir pour décomposer le bicarbonate, on filtre et on précipite par le sulfate de zinc à 10 °/₀ en quantité juste suffisante. Enfin, on filtre le sulfate de baryum et on concentre la solution des sels de zinc. Par refroidissement, le lactate cristallise; on le recueille vingt-quatre heures après et on le purifie par une nouvelle cristallisation dans l'eau. Pour les caractères de ce sel, voir § **173**.

519. — Lorsqu'on opère sur un liquide de culture suffisamment riche, par exemple celui qui provient d'une fermentation lactique typique (§ **477**), on peut caractériser l'acide sans l'extraire au préalable par l'éther. Pour cela, on filtre le liquide lorsque la fermentation est terminée (après cinq ou six jours à peu près), on porte à l'ébullition, et on ajoute peu à peu une solution saturée d'acide oxalique, de manière à précipiter totalement le calcium à l'état d'oxalate. On peut mettre

un très léger excès d'acide oxalique. On filtre ensuite, et le liquide filtré, qui doit être limpide, est bouilli pendant au moins une demi-heure avec un excès de carbonate de zinc. On filtre pour séparer l'excès de carbonate et l'oxalate de zinc insolubles et le liquide filtré, convenablement évaporé au bain-marie, donne par refroidissement une cristallisation de lactate de zinc. Celui-ci apparaît au microscope sous forme de longs cristaux prismatiques souvent groupés en rosettes (*fig.* **22**).

Recherche et dosage de l'acide succinique

520. — On utilisera la méthode indiquée au § **184**, qui est d'une application générale.

Recherche et dosage des acides volatils par la méthode de Duclaux

521. — Cette méthode est particulièrement applicable au dosage des acides volatils dans les liquides de fermentations. On doit commencer par se débarrasser des produits volatils non acides, tels que les alcools, en distillant le liquide au tiers environ, après l'avoir saturé pour retenir les acides volatils.

On met ensuite ces acides en liberté en ajoutant un acide fixe en léger excès. On se sert pour cela d'acide tartrique, qui a l'avantage, dans le cas fréquent où le liquide de fermentation contient des sels de calcium, de donner, si on attend quelques heures, un précipité cristallin de tartrate, facile à séparer par décantation.

En débarrassant ainsi le liquide à distiller de tout ou partie de sa chaux, on diminue sa richesse en éléments fixes et on le rend plus favorable au dosage des acides volatils, dosage qui est d'autant plus précis que le liquide à étudier se rapproche plus d'une simple dissolution d'acides volatils dans l'eau pure.

522. — *Principe de la méthode.* Le principe de la méthode est le suivant : supposons une solution à 1 ou 2 $^0/_0$, au maximum, d'un acide volatil quelconque; amenons-la à un volume constant, par exemple de 110 centimètres cubes et distillons-la dans un ballon de 250 à 300 centimètres cubes, en relation avec un réfrigérant ordinaire. Recueillons dans cette distillation dix prises successives, chacune de 10 centimètres cubes, exactement mesurés. Chacune de ces prises est saturée à part, à l'aide d'une solution alcaline quelconque, et on inscrit à la suite les unes des autres les lectures faites successivement sur la burette. Supposons que la quantité d'acide total introduite dans le ballon exige 100 centimètres cubes de la solution alcaline employée. Les lectures successives représenteront alors, en centièmes, les proportions de cet acide existant dans les 10, 20, 30, 40, etc. premiers centimètres cubes passés à la distillation. Cela posé, on peut considérer comme démontrées les trois lois suivantes :

1° La marche des nombres dans cette série d'opérations est caractéristique de l'acide volatil employé;

2° Il existe un rapport constant entre la quantité d'acide introduite dans le ballon et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, de sorte que de la quantité passée dans les 10, 20, 30, 40... premiers cen-

timètres cubes, on peut conclure à la quantité d'acide total introduit dans le ballon de distillation ;

3° S'il y a deux acides mélangés, chacun se comporte comme s'il était seul et suit les lois de sa distillation propre.

Voyons maintenant comment on peut utiliser ces lois dans la pratique.

523. — *Cas d'un seul acide.* Examinons d'abord le cas où il n'y a qu'un seul acide présent dans le liquide à distiller. On mesure exactement 110 centimètres cubes de liquide dans un ballon de 250 centimètres cubes de capacité, et on distille assez vite pour que l'opération ne dure pas plus de quarante à quarante-cinq minutes.

On recueille le liquide qui distille dans de petites fioles jaugées de 10 centimètres cubes ; le bec du réfrigérant, taillé en biseau, doit être placé à une hauteur telle, au-dessus de la table, qu'il s'appuie très légèrement sur le col de la petite fiole jaugée. On surveille soigneusement la distillation et, dès que le liquide affleure au trait de jauge, on fait glisser brusquement la fiole jaugée, que l'on remplace par une seconde semblable. Si la fiole contenait un peu de liquide en excès, on enlèverait celui-ci avec une pipette finement effilée, et on le ferait couler, en soufflant, dans la seconde fiole jaugée.

La première prise de 10 centimètres cubes est aussitôt versée dans un grand verre à pied de 250 à 300 centimètres cubes ; on rince à trois reprises la fiole avec 2 à 3 centimètres cubes d'eau distillée, que l'on ajoute au contenu du verre, puis on égoutte la fiole avec soin en la posant, l'ouverture en bas, sur des doubles de papier à

filtrer. Le liquide est neutralisé avec une liqueur alcaline, de l'eau de chaux de préférence, qui se trouve naturellement, lorsqu'elle est saturée, à un degré de concentration très convenable pour ces essais. On emploie la phtaléine du phénol comme indicateur et on note le volume d'eau de chaux employé, lu sur la burette. Dès que la seconde fiole jaugée est remplie, on verse dans le même verre le liquide acide qu'elle contient, en la remplaçant sous le réfrigérant par la première fiole. On sature de nouveau l'acidité, sans remplir la burette jusqu'au zéro, et on continue ainsi jusqu'à ce que l'on ait recueilli dix prises successives. On arrête aussitôt la distillation, pour éviter la rupture du ballon.

Si on cherche le rapport des volumes d'eau de chaux nécessaires pour saturer les 10, 20, 30... premiers centimètres cubes au volume nécessaire pour saturer l'acide total du ballon, on trouve les rapports suivants pour les acides volatils les plus habituellement rencontrés dans les fermentations.

PREMIÈRE TABLE

	Acide formique	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide valérianique
	—	—	—	—	—
10cm3	3,5	5,9	11,5	17,3	30,5
20 —	7,2	12,2	22,8	32,7	53,0
30 —	11,3	18,7	33,5	47,0	69,5
40 —	15,5	25,6	44,0	58,5	81,0
50 —	20,2	32,7	54,0	68,8	88,5
60 —	25,5	40,4	63,3	77,5	93,5
70 —	31,1	48,7	72,5	84,3	96,5
80 —	38,5	57,5	81,0	90,5	98,3
90 —	48,0	67,5	88,5	94,6	99,5
100 —	59,0	80,0	95,0	97,5	100,0

La marche de ces distillations se traduit dans les courbes suivantes (*fig.* 56) et on voit que les acides divers passent d'autant plus facilement dans les pre-

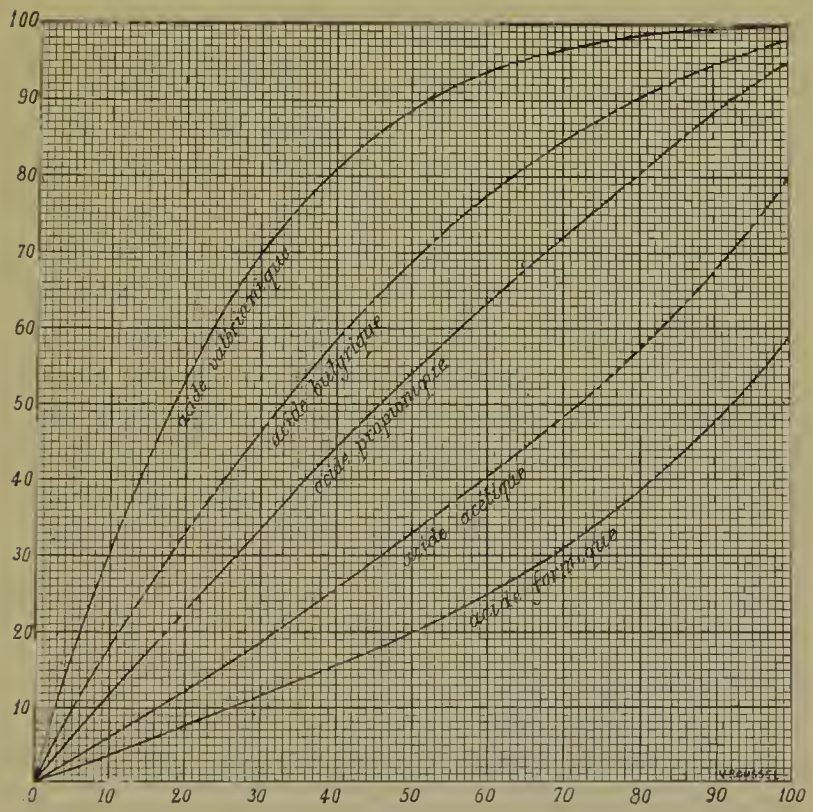


Fig. 56.

mières portions du liquide distillé qu'ils sont moins volatils. Avec l'acide formique et l'acide acétique, le titre des diverses prises augmente constamment : avec l'acide propionique il y a décroissance du titre acide de la première à la dixième ; mais la décroissance est lente. Elle est rapide pour l'acide butyrique, encore

plus pour l'acide valérianique, qui se concentrent tous deux dans le liquide distillé, tandis que les acides acétique et formique se concentrent au contraire dans le liquide resté dans le ballon, ainsi qu'on peut le voir par les nombres de la table.

Il résulte de cela que la marche des chiffres d'une prise à l'autre suffit souvent pour indiquer l'acide auquel on a affaire et, une fois qu'on est assuré de sa nature, on peut, en s'arrêtant à une prise quelconque, et en cherchant dans le tableau ci-dessus le facteur correspondant, savoir la quantité d'acide volatil existant dans le liquide du ballon. Par exemple, si on a fait dix prises, et que la marche des nombres coïncide avec celle de l'acide acétique, il suffira, le facteur correspondant à 100 centimètres cubes recueillis étant 80,0, de multiplier par 100/80 ou plus simplement par 5/4 le poids d'acide trouvé dans les dix prises pour avoir le poids de l'acide contenu dans la liqueur distillée.

Le *nom* de l'acide est donc fourni par la marche des nombres fournis par les diverses prises successives. Au lieu d'évaluer ces nombres en centièmes de l'acide du ballon, sur lequel on ne sait rien à l'avance, il est plus commode de les évaluer en centièmes de l'acide passé dans les 100 centimètres cubes du liquide recueilli. Cela revient à prendre le rapport des nombres contenus dans les colonnes du tableau ci-dessus au nombre du bas de la colonne, et on a alors un autre tableau qui est le suivant :

DEUXIÈME TABLE

	Acide formique	Acide acetique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide valérianique
	—	—	—	—	—
10cm3	5,9	7,4	12,1	17,6	30,5
20 —	12,2	15,2	24,0	33,6	53,0
30 —	19,0	23,4	35,3	47,5	69,5
40 —	26,4	32,0	46,2	60,0	81,0
50 —	34,4	40,9	56,8	70,6	88,5
60 —	43,2	50,5	66,7	79,5	93,5
70 —	52,8	60,9	76,2	86,5	96,5
80 —	64,6	71,9	85,0	92,5	98,3
90 —	79,6	84,4	93,0	97,0	99,5
100 —	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Les courbes ci-dessus traduisent encore la marche de ces nombres. On voit qu'elles se séparent moins que les précédentes, car, parties du même point 0, elles doivent aboutir au même point 100, mais elles sont encore assez distinctes pour bien différencier les acides (*fig.* 57). Il est donc facile, en comparant aux nombres des tableaux ceux que fournit l'expérience, de savoir à quel acide on a affaire, avec la deuxième table, et de conclure ensuite, à l'aide de la première, du poids qui a passé dans la distillation au poids total contenu dans le liquide distillé.

524. — *Cas d'un mélange de deux acides.* Le cas d'un mélange de deux acides volatils est un peu plus compliqué. On a vu plus haut que chacun d'eux se comporte comme s'il était seul et suit la marche de sa distillation. Si par exemple on a un mélange à équivalents égaux d'acide acétique et d'acide butyrique, la marche des nombres correspondant à la distillation

de ce mélange sera la moyenne des nombres correspondant à chacun des deux acides dans l'un quelconque des tableaux, et la courbe de la distillation sera celle qui, dans chacune des figures qui précèdent, se tien-

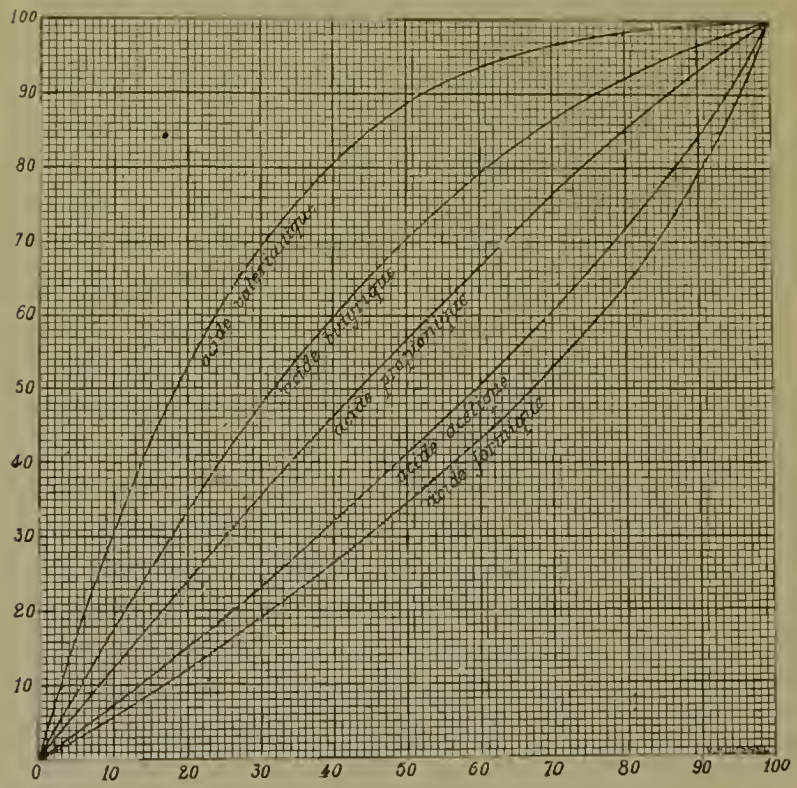


Fig. 57.

drait à égale distance, dans le sens vertical, de la courbe de l'acide acétique et de l'acide butyrique. S'il y a, au contraire, deux molécules d'acide butyrique contre une d'acide acétique, il faudra, pour avoir les nombres de la distillation, ajouter deux fois le nombre correspondant à l'acide butyrique au nombre corres-

pondant à l'acide acétique, et prendre le tiers de la somme obtenue.

Réciproquement, étant donnés les nombres fournis par l'expérience, on peut, en les ordonnant ou en les traduisant sous forme de courbe, voir s'ils coïncident avec l'une des deux courbes de la figure 57 et, s'il n'y a pas coïncidence, voir entre quelles courbes de la figure la courbe trouvée vient se placer. Une fois cette courbe tracée, la question de savoir à quels acides elle est due devient une question de tâtonnements méthodiques, au milieu desquels un peu d'habitude apprend rapidement à se débrouiller.

Pour un mélange d'acide formique et d'acide acétique, dont les deux courbes ont la convexité tournée du même côté, la courbe résultante a une courbure régulière tournée dans le même sens, et les nombres sont régulièrement croissants du premier au dernier.

De même, mais en sens inverse, pour les mélanges d'acide butyrique et d'acide valérianique, dont les courbures sont aussi de même sens, la courbe résultante a une courbure régulière intermédiaire, et les nombres des diverses prises sont régulièrement décroissants, intermédiaires entre ceux des deux acides, et d'autant plus voisins de ceux de l'un d'eux que l'autre est moins abondant. De ce côté, donc, aucune difficulté.

Envisageons maintenant le mélange de deux acides à modes de distillation opposés, et pour aller aux extrêmes, prenons un mélange d'acide formique et d'acide valérianique à équivalents égaux. Les nombres correspondant à la distillation de ce mélange sont les

suivants, qu'on obtient en prenant la moyenne de ceux de la deuxième table :

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18,2	32,6	44,2	53,7	61,5	68,4	74,6	81,5	89,5	100

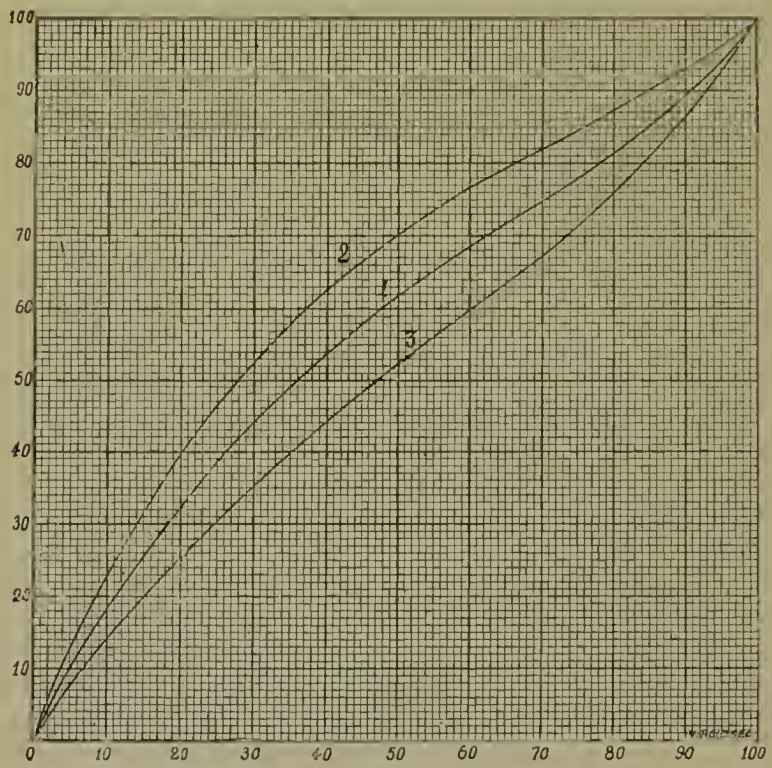


Fig. 58.

et la courbe 1 correspondante (*fig.* 58) est une courbe à double courbure, où les titres des prises décroissent au début, parce que l'acide valérianique distille à ce moment, puis croissent à la fin parce que c'est le tour de l'acide formique.

De même le mélange de 2 d'acide valérianique avec

1 d'acide formique donne naissance à la courbe 2 ; le mélange de 2 d'acide formique avec 1 d'acide valérianique à la courbe 3, et on voit que la position du point d'inflexion de la courbe varie avec la proportion des acides mélangés.

Une courbe à double courbure, si peu accentuée qu'elle soit, ou une marche irrégulière dans la croissance ou la décroissance des nombres indique donc un mélange d'acide supérieur à l'acide propionique avec de l'acide acétique ou formique, et dès lors il n'y a qu'à chercher, soit au moyen des courbes, soit en combinant convenablement les chiffres des tableaux, quelle est la combinaison d'acides qui donne la marche de la distillation la plus voisine de celle qu'on a trouvée par l'expérience.

525. — *Nature des acides mélangés.* Ici, comme tout à l'heure, le problème se décompose en deux : trouver d'abord la nature des deux acides, déterminer ensuite leurs proportions.

Dans les tâtonnements au sujet de la nature, on peut s'aider de tous les renseignements qu'on a sous la main : c'est ainsi que l'acide valérianique se distingue facilement de l'acide butyrique par son odeur, l'acide formique de l'acide acétique par son action sur le nitrate d'argent à l'ébullition. En somme il est facile, quand on est assuré, par la forme de la courbe, d'avoir affaire à un mélange binaire d'acide butyrique ou d'acide valérianique, avec de l'acide acétique ou de l'acide formique, de savoir quels sont les deux acides auxquels on a affaire. On reviendra tout à l'heure au cas de l'acide propionique.

En résumé, la marche régulière des nombres, ou la forme régulière des courbes avertit si on a affaire à un mélange d'acide acétique avec l'acide formique et d'acide butyrique avec l'acide valérianique. La marche irrégulière, décroissante d'abord, croissante ensuite, des nombres de distillation, ou la double courbure des courbes avertissent d'un mélange d'un des deux premiers acides avec un des deux derniers, et à moins que l'un de ces acides ne soit présent en quantités très faibles, il est en général facile de savoir le nom des deux acides mélangés. Reste à savoir leur proportion dans le mélange.

526. — *Proportion des acides mélangés.* C'est encore comme tout à l'heure l'étude des nombres ou des courbes qui nous la fournit. Les nombres fournis par l'expérience partagent la différence entre les nombres normaux correspondant aux deux acides, en parties inversement proportionnelles aux quantités d'acide présentes dans la liqueur. On prend donc la différence des nombres de l'expérience aux nombres supérieur et inférieur correspondants de la deuxième table, et le rapport de ces différences donne une valeur approximative du rapport de l'acide inférieur à l'acide supérieur. On peut, si on veut, déterminer neuf de ces valeurs approximatives et prendre leur moyenne, mais il est évident que celles qui correspondent à la région où les courbes sont les plus écartées l'une de l'autre, ont une précision supérieure à celles qu'on détermine au voisinage du commencement ou de la fin de l'expérience, où les courbes sont très voisines et finissent par se confondre. Pratiquement, on se contentera de

prendre la moyenne des rapports correspondant à 30, 40, 50, 60, 70 centimètres cubes, et on aura le rapport cherché, avec une exactitude supérieure à celle que donnerait tout autre procédé d'analyse connu jusqu'ici.

Une fois ce rapport connu, il n'y a plus de difficulté. On cherche, au moyen de la première table, dans quelle proportion devrait passer, dans les dix premières prises, un mélange d'acides dans le rapport trouvé, et on passe ainsi facilement du volume d'eau de chaux employé à saturer le liquide distillé à celui qui serait nécessaire pour saturer les acides volatils du ballon. Connaissant ce que peut saturer d'eau de chaux le mélange, le titre de l'eau de chaux et la proportion en équivalents des acides mélangés, il est facile de savoir ce qu'il y a de l'un et de l'autre.

527. — *Cas de l'acide propionique.* Revenons maintenant à l'acide propionique, intermédiaire entre les acides acétique et butyrique. La marche des nombres de la distillation est à peu près la même pour l'acide propionique et le mélange à équivalents égaux des deux acides voisins.

Les différences se traduisent mieux sur les courbes, parce que celle de l'acide propionique conserve la courbure régulière, bien que peu prononcée, qu'elle a sur la figure 57, tandis que celle du mélange présente la double courbure, habituelle aux mélanges, que nous avons signalée plus haut. Néanmoins, comme les différences sont faibles, elles peuvent échapper, et on est exposé par suite à confondre de l'acide propionique avec un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique.

Il y a heureusement un moyen très simple d'éviter

cette indécision, c'est de distiller à moitié la liqueur sur laquelle on a des doutes et d'en recueillir séparément les deux moitiés. Si l'acide qu'elle contient est pur, les deux fractionnements contiendront le même acide, et, soumis séparément à une nouvelle distillation fractionnée aux 10/11, ils donneront les mêmes nombres de distillation. Si, au contraire, c'est un mélange d'acide butyrique et d'acide acétique, le premier acide passera de préférence dans le premier fractionnement, l'acide acétique dans le dernier, et, à une distillation fractionnée nouvelle, les deux moitiés se comporteront différemment, de façon à lever tous les doutes.

Ce fractionnement à moitié ou au tiers, ou au quart, suivant les cas, est à recommander toutes les fois que, l'un des acides mélangés étant en faible proportion par rapport à l'autre, l'étude faite sur le liquide en bloc en laisse la nature et la quantité douteuses. Il est alors toujours possible, par la distillation, de concentrer cet acide soit dans les premières portions, si c'est de l'acide butyrique ou de l'acide valérianique, dans les dernières si c'est de l'acide acétique ou formique, de façon à ce qu'il y existe en proportions suffisantes pour être reconnu.

Enfin, cette même méthode des distillations préliminaires peut aussi rendre des services quand on a affaire à des mélanges de trois acides auxquels notre méthode ne s'applique plus. Des mélanges aussi complexes sont très rares dans les fermentations pures, et quand ils se produisent, l'un des trois acides, généralement celui dont le poids atomique est le plus élevé, n'existe qu'en proportions infinitésimales. On profite pour le séparer de ce que, dans les vingt premiers cen-

timètres cubes du liquide recueilli dans les conditions de la méthode, il y a la moitié de l'acide valérianique et les soixante centièmes de l'acide caproïque. Ce qui reste dans le ballon, à ce moment, est donc débarrassé d'une forte proportion du troisième acide, et s'il n'y en avait au départ que très peu, ce qui reste est en trop faible quantité pour gêner l'application de la méthode.

On peut simplifier notablement les tâtonnements et les calculs relatifs à la proportion des acides mélangés par l'emploi des tables suivantes, qui donnent la marche de la distillation, pour des mélanges divers des acides les plus fréquemment rencontrés dans les fermentations. On ne s'est astreint pour tous ces mélanges qu'à calculer les rapports pour la région dans laquelle les courbes s'écartent le plus, et où les mesures sont les plus précises. Cette région est variable d'un mélange à l'autre, et indiquée par le volume des prises pour lesquelles elle commence et elle finit.

Voici quels sont, dans ces limites, pour les mélanges d'acides dont les proportions sont indiquées dans la première colonne, les rapports de distillation qu'on peut déduire des nombres de la page **417** :

Mélanges d'acide valérianique et d'acide acétique

	20	30	40	50	60	70 cm3
	—	—	—	—	—	—
Acide valérianique pur	53,0	69,5	81,0	88,5	93,5	96,5 —
20 ac. val. : 1 ac. acét.	52,2	67,3	78,6	86,2	91,4	94,8 —
10 — 1 —	49,5	65,3	76,5	84,2	89,6	93,3 —
8 — 1 —	48,8	64,4	74,4	83,2	88,7	92,5 —
6 — 1 —	47,6	62,9	74,0	81,7	87,3	91,4 —
5 — 1 —	46,7	61,8	72,8	80,6	86,1	90,6 —
4 — 1 —	45,4	60,2	71,2	79,0	84,9	89,4 —
3 — 1 —	43,5	58,0	68,8	76,6	82,8	87,6 —

Mélanges d'acide valérianique et d'acide acétique (*suite*)

	20	30	40	50	60	70 mc3
	—	—	—	—	—	—
2 — 1 —	40,4	54,1	64,7	70,1	79,2	84,6 —
1 — 1 —	34,1	46,4	56,5	64,7	77,0	78,7 —
1 — 2 —	27,8	38,8	48,3	56,8	64,8	72,8 —
1 — 3 —	24,6	34,4	44,4	52,8	61,2	69,8 —
1 — 4 —	22,8	32,6	41,8	50,4	59,1	67,8 —
1 — 5 —	21,5	31,1	40,1	48,8	57,7	66,8 —
1 — 6 —	20,6	30,0	39,0	47,7	56,6	66,0 —
1 — 8 —	19,4	28,5	37,4	46,2	55,3	64,8 —
1 — 10 —	18,6	27,6	36,4	45,2	54,4	64,1 —
1 — 20 —	17,0	25,1	34,3	43,1	52,5	63,1 —
Acide acétique pur	15,2	23,4	32,0	40,9	50,5	60,9 —

Mélanges d'acide butyrique et d'acide acétique

	30	40	50	60	70	80 cm3
	—	—	—	—	—	—
Acide butyrique pur	47,5	60,0	70,6	79,5	86,5	92,5 —
10 ac. but. : 1 ac. acét.	45,3	57,5	67,9	76,9	84,2	90,6 —
5 — 1 —	43,5	55,3	65,6	74,7	82,2	89,1 —
4 — 1 —	42,6	54,4	64,6	73,7	83,0	88,4 —
3 — 1 —	41,5	53,0	63,2	72,2	80,1	87,3 —
2 — 1 —	39,5	50,8	60,7	69,8	78,9	85,6 —
1 — 1 —	35,2	46,0	55,7	65,0	73,7	82,2 —
1 — 2 —	31,4	41,3	50,8	60,2	69,4	78,8 —
1 — 3 —	29,4	39,0	48,8	57,7	67,3	77,0 —
1 — 4 —	28,2	37,6	46,8	56,3	66,0	76,0 —
1 — 5 —	27,4	36,7	45,8	55,3	65,2	75,3 —
1 — 10 —	25,6	34,5	43,6	53,1	63,2	73,8 —

Mélanges d'acide propionique et d'acide acétique

	30	40	50	60	70	80 cm3
	—	—	—	—	—	—
Acide propionique pur	35,3	46,2	56,8	66,7	76,2	85,0 —
5 ac. prop. : 1 ac. acét.	33,3	43,8	54,2	64,0	73,6	82,8 —
4 — 1 —	32,9	43,3	53,6	63,4	73,0	82,2 —
3 — 1 —	32,3	42,6	52,8	62,6	72,4	81,7 —
2 — 1 —	31,3	41,1	51,9	61,3	71,1	80,6 —
1 — 1 —	29,3	39,1	48,9	58,6	68,5	78,5 —
1 — 2 —	27,4	36,7	46,2	55,9	66,0	76,3 —
1 — 3 —	26,4	35,5	44,9	54,5	64,7	75,2 —
1 — 4 —	25,8	34,8	44,1	53,7	64,0	74,5 —
1 — 5 —	25,4	34,4	43,6	53,2	63,5	74,0 —

Mélanges d'acide valérianique et d'acide butyrique

	10	20	30	40	50	60 cm3
	—	—	—	—	—	—
Acide valérianique pur	30,5	53,0	69,5	81,0	88,5	93,5 —
10 ac. val. : 1 ac. but.	29,3	51,2	67,5	79,1	86,9	92,2 —
5 — 1 —	28,3	49,8	65,8	77,5	85,5	91,2 —
4 — 1 —	27,9	49,1	65,1	76,8	84,9	90,7 —
3 — 1 —	27,3	48,1	64,0	75,8	84,0	90,0 —
2 — 1 —	26,2	46,5	62,2	74,0	82,5	88,8 —
1 — 1 —	24,1	43,3	58,5	70,5	79,5	86,5 —
1 — 2 —	21,9	40,1	54,8	67,0	76,6	84,2 —
1 — 3 —	20,8	38,4	52,8	65,2	75,1	83,0 —
1 — 4 —	20,2	37,5	51,9	64,2	74,2	82,2 —
1 — 5 —	19,8	37,0	51,2	63,5	73,6	81,8 —
1 — 10 —	18,8	35,4	49,5	61,8	72,2	80,8 —
Acide butyrique pur	17,6	33,6	47,5	60,0	70,6	79,5 —

Mélanges d'acide valérianique et d'acide propionique

	20	30	40	50	60	70 cm3
	—	—	—	—	—	—
Acide valérianique pur	53,0	69,5	81,0	88,5	93,5	96,5 —
10 ac. val. : 1 ac. prop.	50,4	66,4	77,8	85,5	91,0	94,6 —
5 — 1 —	48,2	63,8	75,2	83,2	89,0	93,2 —
4 — 1 —	47,2	62,6	74,0	82,2	88,1	92,4 —
3 — 1 —	45,7	60,9	72,3	80,6	86,8	91,4 —
2 — 1 —	43,3	58,1	69,4	77,9	84,6	89,7 —
1 — 1 —	38,5	52,4	63,6	77,6	80,1	86,3 —
1 — 2 —	33,7	46,7	57.8	66,7	75,6	83,0 —
1 — 3 —	31,2	43,8	54,8	64,7	73,4	81,3 —
1 — 4 —	29,8	42,1	53,2	63,2	72,1	80,2 —
1 — 5 —	28,8	41,0	52,0	62,1	71,0	79,6 —
1 — 10 —	26,6	38,4	48,4	59,7	69,1	78,0 —
Acide propionique pur	24,0	35,3	46,2	56,8	66,7	76,2 —

Mélanges d'acide butyrique et d'acide propionique

	20	30	40	50	60	70 cm3
	—	—	—	—	—	—
Acide butyrique pur	33,6	47,5	60,0	70,6	79,5	86,5 —
8 ac. but. : 1 ac. prop.	32,5	46,1	58,5	69,1	78,1	85,3 —
4 — 1 —	31,7	45,0	57,2	67,8	77,0	84,4 —
3 — 1 —	31,2	44,4	56,5	67,1	76,3	83,9 —
2 — 1 —	30,4	43,4	55,4	66,0	75,1	83,3 —
1 — 1 —	28,8	41,4	53,1	63,7	73,1	81,3 —
1 — 2 —	27,2	39,4	50,8	61,2	71,0	79,6 —
1 — 3 —	26,6	38,3	49,6	60,2	69,9	78,8 —
1 — 4 —	25,9	37,7	49,0	59,5	69,2	78,2 —
1 — 8 —	25,0	36,7	47,7	58,3	68,1	77,3 —
Acide propionique pur	24,0	35,3	46,2	56,8	66,7	76,2 —

Ces tables facilitent singulièrement le travail. Une fois calculée la série des rapports centésimaux pour la fermentation soumise à l'étude, on est averti tout de suite, quand on a un peu d'habitude, soit par la marche des nombres, soit par l'odeur des premières ou des dernières prises, des acides auxquels on a affaire, et on contrôle cette première indication en cherchant sur les tables si la marche des nombres trouvés par l'expérience coïncide avec une des séries calculées. Cette coïncidence n'est naturellement jamais parfaite : les incertitudes de la méthode des distillations, les irrégularités inévitables dans la mesure des prises et dans les dosages ne le permettent pas. Il faut se déclarer satisfait quand la coïncidence a lieu à 1 ou 2 unités du dernier chiffre près, en plus ou en moins. Quand la série trouvée se confond avec ce degré d'approximation avec une des séries du tableau, ce tableau indique de suite la nature et la proportion des acides mélangés. Il arrivera plus souvent que la série se maintiendra entre deux séries consécutives du tableau, tantôt à égale distance des deux, tantôt plus près de l'une que de l'autre. On pourra alors juger le plus souvent, rien que par un calcul mental, du rapport des deux acides dans le mélange.

Recherche de l'ammoniaque

528. — La transformation des matières azotées sous l'action de divers microbes peut donner naissance à de l'ammoniaque, qui se trouve alors dans le milieu de culture à l'état de sels.

On peut souvent caractériser l'ammoniaque dans le

milieu même, au moyen du réactif de Nessler [1]. Il suffit d'ajouter 1 centimètre cube de ce réactif à 10 centimètres cubes du liquide à essayer. On obtient un précipité brun rougeâtre en présence d'une quantité notable d'ammoniaque, ou une simple coloration jaune brun s'il n'y a que des traces de ce corps. La réaction est encore nette avec 1/500.000 d'ammoniaque.

529. — Si on verse dans un tube 10 centimètres cubes de la solution ammoniacale et 1 centimètre cube d'iodure de potassium à 10 $^0/_0$, on obtient un précipité noir par addition de quelques gouttes d'une solution d'hypochlorite alcalin (eau de Javel du commerce). Cette réaction, un peu fugace, est très sensible (Trillat et Turchet). Comme la précédente, elle est donnée par un certain nombre d'amines.

530. — Par addition d'hypobromite de sodium, l'ammoniaque ou les sels ammoniacaux donnent lieu à un dégagement d'azote gazeux. Cette réaction se produit également avec l'urée (§ **327**), les acides urique et hippurique, la créatinine, etc. ; elle n'est pas donnée par les amines.

531. — A 10 centimètres cubes de liquide, neutre ou

---

[1] Pour préparer ce réactif, on dissout 20 grammes d'iodure de potassium dans 50 centimètres cubes d'eau, on chauffe au bain-marie, et on ajoute, en remuant, de l'iodure rouge de mercure tant que ce corps se dissout (40 à 50 grammes). On ajoute 200 centimètres cubes d'eau, on laisse refroidir et on filtre. La solution d'iodomercurate de potassium est alors additionnée de son volume d'une solution de soude pure à 20 $^0/_0$; on laisse reposer pendant vingt-quatre heures, puis on décante.

alcalin, on ajoute 2 centimètres cubes de solution aqueuse de phénol à 4 $^0/_0$ et 2 à 5 gouttes, d'eau de Javel fraîchement préparée, en évitant un excès de cette dernière. Il se produit peu à peu une coloration bleue. La réaction présente la même sensibilité que celle de Nessler. Elle est également donnée par le glycocolle et quelques corps aminés, mais seulement à des concentrations assez élevées (P. Thomas).

532. — Il est préférable, lorsque l'on veut éviter toute indécision, de distiller le liquide de culture en présence d'un peu de magnésie récemment calcinée; on recueille la solution ammoniacale qui passe à la distillation dans un tube contenant 4 à 5 gouttes d'acide sulfurique à 10 $^0/_0$; le liquide obtenu est essayé avec les réactifs indiqués ci-dessus.

Dosage de l'ammoniaque

533. — *Dosage de l'ammoniaque dans une fermentation.* On opère de même lorsqu'il s'agit de doser l'ammoniaque dans un milieu de culture, tel que l'urine qui a subi la fermentation ammoniacale (§ **484**). Comme l'urée résiduelle est fortement attaquée par les alcalis, on opère la distillation en présence de magnésie, qui n'agit pas sur l'urée aux températures inférieures à 60° et n'exerce à 100° qu'une très faible action, proportionnelle à la durée du chauffage (Berthelot et André).

534. — On verse dans le ballon de l'appareil d'Aubin (§ **39**) 5 centimètres cubes d'urine, on ajoute 150 à 200 centimètres cubes d'eau distillée, puis quelques

grammes de magnésie récemment calcinée, en poudre fine, et on fait bouillir. L'ammoniaque qui distille est titrée par l'acide sulfurique N/5 en présence d'orangé.

Pour tenir compte de la faible quantité d'ammoniaque provenant de l'hydrolyse de l'urée en présence de magnésie, on arrête la distillation lorsque la quantité d'ammoniaqne qui passe est très faible et proportionnelle au temps, puis on note la durée d'ébullition de la solution contenant l'urée (3/4 d'heure environ).

On verse alors dans le ballon de l'appareil un volume d'eau égal à celui qui a passé à la distillation, de manière à ramener à la même concentration ; on recommence celle-ci en faisant bouillir pendant un temps égal à celui de la première opération. La quantité d'ammoniaque qui passe, déterminée par titrage, correspond à l'hydrolyse de l'urée dans les conditions de l'expérience; il suffit de la déduire du chiffre trouvé lors de la distillation préliminaire pour effectuer la correction.

535. Lorsqu'on veut avoir des résultats absolument précis, on opère la distillation en présence de magnésie, dans le vide, à une température inférieure à 50°. On adapte à l'appareil d'Aubin un flacon contenant une quantité connue, en excès, d'acide sulfurique titré, qui absorbe l'ammoniaque. Il ne reste plus ensuite qu'à doser l'acide en excès.

536. — *Dosage de l'ammoniaque et des acides aminés dans l'urine.* Lorsqu'on veut doser rapidement et d'une façon approximative l'ammoniaque contenu dans l'urine, on peut se contenter de la méthode suivante,

suffisante pour les essais cliniques (Ronchèse). Il ne faut pas oublier qu'elle donne, en même temps que l'ammoniaque, les acides aminés dont la teneur n'est pas tout à fait négligeable dans certaines urines pathologiques.

537. — On verse dans un verre 10 centimètres cubes d'urine exactement mesurés et on ajoute 100 centimètres cubes d'eau distillée bouillie, puis quelques gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine. On verse alors, au moyen d'une pipette, de la soude décime jusqu'à apparition d'une teinte rose, de façon à neutraliser. Le liquide est additionné de 20 centimètres cubes de solution commerciale d'aldéhyde formique à 40 $^0/_0$, préalablement étendus d'un égal volume d'eau et neutralisés exactement, puis on ajoute de la soude décime jusqu'à coloration rose.

Dans la réaction de l'aldéhyde formique sur les sels ammoniacaux, l'ammoniaque est fixée à l'état d'hexaméthylènetétramine et les acides sont mis en liberté.

Le volume n de soude décime employé correspond donc à l'ammoniaque présente. Par suite du retard exercé sur le virage de la phtaléine, lors de la neutralisation de l'urine en présence des sels ammoniacaux, le chiffre trouvé doit être augmenté de 1/30 de sa valeur (Ronchèse). La quantité d'ammoniaque par litre d'urine est donc :

$$n \times \frac{31}{30} \times 0{,}0017 \times 100 = n \times 0{,}1757.$$

Recherche de l'indol

538. — Un certain nombre de microbes de la putréfaction, le colibacille, le vibrion cholérique, etc., sont capables de produire de l'indol en quantité appréciable.

La présence de ce corps peut être soupçonnée lorsque les cultures dégagent l'odeur caractéristique de l'indol (odeur de carie dentaire); on confirmera cette présence à l'aide des réactions suivantes.

539. — A 10 centimètres cubes de milieu de culture, on ajoute 1 centimètre cube d'une solution de nitrite de sodium à 1/10.000, puis, avec précaution, en agitant, 20 à 25 gouttes d'acide sulfurique concentré. Il se fait une coloration rose ou rouge due au nitroso-indol. Cette coloration est plus ou moins masquée par la teinte du liquide; on peut la rendre plus nette en agitant avec 2 centimètres cubes d'alcool amylique qui rassemble la matière colorante et vient former à la surface une couche teintée de rouge.

Lorsque le milieu de culture renferme des traces de nitrates, ceux-ci peuvent être réduits à l'état de nitrites, en même temps qu'il se fait de l'indol ; c'est le cas du vibrion cholérique.

Il suffit alors d'ajouter au milieu de culture de l'acide sulfurique pour voir apparaître la coloration rouge caractéristique (réaction dite du rouge de choléra).

540. — Lorsqu'il n'y a que des traces d'indol, on pourra séparer ce corps en utilisant sa propriété d'être entraînable par un courant de vapeur d'eau.

On utilisera dans ce but l'appareil du § **183**. Le liquide étudié étant rendu légèrement acide par addition d'un peu d'acide chlorhydrique, on l'introduit dans le petit ballon D et on distille. Le liquide recueilli peut renfermer, à côté de l'indol, du scatol, des phénols, des acides gras, etc. On l'alcalinise légèrement avec de la soude, puis on l'introduit de nouveau dans le ballon et on distille encore une fois. L'indol peut être caractérisé dans le liquide obtenu au moyen du *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (P. Ehrlich.) Pour cela, on ajoute à 10 centimètres cubes de liquide 8 à 10 gouttes de solution alcoolique à 5 $^0/_0$ de ce réactif, puis, goutte à goutte, de l'acide sulfurique concentré (1 centimètre cube environ). Il se produit une belle coloration rose. On peut aussi faire couler l'acide au fond du tube, au moyen d'un tube de verre effilé ; il se forme à la surface de séparation des deux liquides un anneau rouge violacé.

541. — L'indol donne avec le β-naphtoquinone-monosulfonate de sodium, en milieu alcalin, un dérivé coloré en bleu foncé (Herter). Pour faire la réaction, on ajoute à 10 centimètres cubes de solution très diluée d'indol 1 goutte de potasse à 10 $^0/_0$, puis 1 à 2 gouttes de naphtoquinone-sulfonate de sodium, en solution aqueuse à 2 $^0/_0$. Il se développe peu à peu une coloration bleue ; le chauffage favorise la réaction. En agitant le liquide avec 1 à 2 centimètres cubes de chloroforme, celui-ci se colore en rouge, tandis que la couche aqueuse se décolore.

Il faut éviter un excès d'alcool, qui, au lieu d'une coloration bleue, ferait apparaître une teinte verdâtre.

Recherche du scatol

542. — Le scatol accompagne très souvent l'indol dans les putréfactions. Il possède l'odeur des matières fécales. Comme l'indol, il est facilement entraîné par la vapeur d'eau.

Le scatol se distingue de l'indol parce qu'il ne donne pas de coloration avec l'acide sulfurique et le nitrite de sodium.

543. — Traité par le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde en solution à 5 $^0/_0$ dans l'alcool et l'acide sulfurique, dans les conditions indiquées au § **540**, le scatol donne une coloration violette qui vire au bleu après quelque temps.

544. — Si on ajoute à quelques centimètres cubes de solution de scatol 1 goutte de potasse à 10 $^0/_0$, puis 1 à 2 gouttes de solution de naphtoquinone-monosulfonate de sodium à 2 $^0/_0$, le liquide se colore en orangé, devenant plus intense par chauffage. Le chloroforme, agité avec ce liquide, reste incolore.

CHAPITRE XXIII

PHÉNOMÈNES SYNTHÉTIQUES

Assimilation des éléments
Culture de l'Aspergillus niger sur liquide Raulin

545. — Le liquide dont la formule a été indiquée par Raulin présente cette particularité de fournir sous une forme minérale simple tous les éléments nécessaires à la vie de l'*Aspergillus niger;* il faut, bien entendu, excepter le sucre qui apporte le carbone et l'hydrogène, et dont une partie fournit par sa combustion l'énergie nécessaire au développement de la plante, et l'acide tartrique qui a pour but de donner au milieu la légère acidité favorable aux moisissures telles que l'*Aspergillus*. Il est facile d'étudier l'influence d'un élément donné en le supprimant de la composition du milieu et examinant le développement du végétal dans ces conditions. On peut ainsi déterminer facilement le rôle de l'acide phosphorique et celui de la potasse.

546. — Pour cela, on prépare d'abord les solutions suivantes :

1°	Acide tartrique.....	$2^{gr},667$ %
	et carbonate de magnésium à.	$0^{gr},267$ %
2°	Nitrate d'ammonium à.....	$2^{gr},667$ %
3°	Phosphate d'ammonium à.....	$0^{gr},4$ %
4°	Carbonate de potassium à.....	$0^{gr},4$ %
5°	Sulfate d'ammonium à.....	$0^{gr},167$ %
6°	Sulfate de zinc à.....	$0^{gr},0467$ %
7°	Sulfate de fer à.....	$0^{gr},0467$ %
8°	Silicate de sodium à.....	$0^{gr},0467$ %

et enfin, une solution de 35 grammes de saccharose dans 150 centimètres cubes d'eau distillée.

Pour obtenir le liquide Raulin *complet*, on verse dans un matras 50 centimètres cubes de la solution sucrée, et on y ajoute 25 centimètres cubes de chacune des huit solutions indiquées, en agitant pour mélanger le tout. On obtient ainsi 250 centimètres cubes de liquide que l'on versera dans une cuvette à photographie en faïence du modèle 13 × 18.

Si on désire préparer le Raulin *sans potasse*, on opère exactement de même, mais en remplaçant les 25 centimètres cubes de solution de carbonate de potassium par 25 centimètres cubes d'eau distillée, ou de solution de carbonate de sodium à 0,3 %.

Enfin, pour avoir du Raulin *sans acide phosphorique*, on opère comme pour le liquide complet, mais on remplace les 25 centimètres cubes de solution de phosphate d'ammonium par 25 centimètres cubes d'une solution de sulfate d'ammonium à 0,4 %.

547. — Les trois liquides sont versés dans trois cu-

vettes; on les ensemence en versant dans chacune 10 gouttes d'une suspension de spores d'*Aspergillus niger* dans un peu d'eau. On agite pour répartir uniformément les spores et on place les cuvettes à l'étuve à 37°. Il est bon de placer au-dessus une lame de verre posée sur une baguette de verre recourbée en forme de V, de manière à permettre une bonne aération, tout en s'opposant à une trop grande évaporation du liquide.

Fig. 59. — Aspergillus niger.
a, appareil sporifère ;
b, détail d'un capitule ; *s*, spores.

On voit au bout de vingt-quatre heures le mycélium blanc commencer à se développer; après trois à quatre jours, le développement est entièrement terminé, et on a une galette épaisse et résistante sur le liquide complet; sur les deux autres liquides se voient seulement des îlots d'un mycélium mince et peu cohérent. On peut d'ailleurs enlever ces mycéliums, les laver, puis les égoutter et les sécher à l'étuve jusqu'à poids constant. Le rapport des poids obtenus donne une idée de l'importance de l'élément supprimé pour le développement du végétal.

Au microscope, la moisissure présente l'aspect indiqué ci-contre (*fig.* 59).

Assimilation chlorophyllienne : Dégagement d'oxygène

548. — Les plantes vertes peuvent, grâce à la chlorophylle, décomposer le gaz carbonique sous l'action de la lumière. En présence de l'eau, il y a fixation du carbone avec production transitoire d'aldéhyde formique et dégagement d'oxygène.

Il est facile de montrer ce dégagement. Pour cela, on place dans une éprouvette d'un demi-litre quelques tiges de plantes aquatiques, comme le potamot ou l'élodée, garnies de leurs feuilles, on remplit avec de l'eau presque saturée de gaz carbonique (eau de Seltz étendue de 4 à 5 volumes d'eau) et on retourne l'éprouvette dans un vase rempli de la même solution. Si on expose le tout à la lumière directe du soleil, on voit les feuilles se couvrir de fines bulles gazeuses qui se détachent peu à peu et se rassemblent à la partie supérieure. Ce gaz est de l'oxygène, avec un peu d'anhydride carbonique entraîné.

Quand le volume dégagé est suffisant, on transvase le gaz dans un tube à essai, en s'aidant d'un entonnoir et en opérant sur la cuve à eau. On introduit ensuite dans le tube une pastille de potasse, on bouche avec le doigt et on agite, de façon à absorber le gaz carbonique. Si on redresse le tube et qu'on y introduise une allumette présentant un point en ignition, on voit l'allumette s'enflammer aussitôt montrant la présence de l'oxygène.

Production d'aldéhydes volatils dans les feuilles vertes

549. — L'aldéhyde formique provenant de la fixation du carbone par les feuilles est accompagné d'aldéhyde ordinaire et d'autres aldéhydes volatils plus complexes.

On peut facilement montrer la formation de ces corps en distillant des feuilles avec de l'eau.

On introduit dans un ballon de 1 litre des feuilles *fraîches* de hêtre, de marronnier, de tilleul, etc., en évitant de tasser trop fortement ; on ajoute ensuite assez d'eau pour remplir le ballon aux 2/3, et on l'adapte à l'appareil d'Aubin, puis on distillle. Le liquide distillé réduit énergiquement le nitrate d'argent ammoniacal et le réactif de Nessler, comme la plupart des aldéhydes.

550. — Si on ajoute à 5 centimètres cubes de ce liquide un égal volume de solution aqueuse saturée d'aniline (obtenue en agitant quelques gouttes d'aniline avec de l'eau et filtrant sur un filtre mouillé), on voit se former après quelques minutes un trouble blanc laiteux dû à la précipitation des produits de condensation de l'aniline avec les aldéhydes.

Réactions de l'aldéhyde formique

551. — L'aldéhyde formique réduit le nitrate d'argent ammoniacal et le réactif de Nessler ; il donne avec la solution aqueuse d'aniline un trouble blanc laiteux. Ces réactions sont également données par les aldéhydes de la même série.

552. — Si on ajoute à 10 centimètres cubes de la solution dans laquelle on recherche l'aldéhyde formique 2 centimètres cubes d'une solution récente et filtrée de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 $^0/_0$, 1 centimètre cube de solution récente de ferricyanure de potassium à 5 $^0/_0$ et 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré, il se développe, en présence de formaldéhyde, une belle coloration rouge fuchsine.

553. — Cette réaction peut être obtenue même en présence de divers pigments, en opérant comme suit. Si on effectue la recherche sur un extrait alcoolique de feuilles vertes, par exemple, très riche en chlorophylle, on évapore doucement au bain-marie pour chasser l'alcool. Le résidu est repris par 10 centimètres cubes d'eau, sur lesquels on fait la réaction comme il est indiqué plus haut. On étend ensuite le liquide avec 2 volumes d'eau et on agite avec 5 à 10 centimètres cubes d'éther.

Le sel coloré en rouge se dissocie, et la base passe dans l'éther, qui présente une teinte jaune pâle. On décante l'éther, on le verse dans un tube à essai, puis on lui ajoute 1 à 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré ; ce dernier se colore en rouge par suite de la formation du chlorhydrate très coloré (Schryver).

554. — L'aldéhyde formique se condense avec la diméthylaniline pour donner un composé de formule

$$CH^2 = \left(C^6H^4N \begin{matrix} \diagup CH^3 \\ \diagdown CH^3 \end{matrix}\right)^2,$$

qui fournit sous l'influence de l'oxydation un colorant bleu (A. Trillat).

Pour faire la recherche, on distille le liquide contenant l'aldéhyde et on prend 50 centimètres cubes du liquide distillé, que l'on introduit dans un flacon à l'émeri de 75 centimètres cubes environ, avec 1 centimètre cube de diméthylaniline bien pure et récemment distillée (bouillant à 191-192°) et 10 à 15 gouttes d'acide sulfurique à 10 $^0/_0$. On bouche et on chauffe sur le bain-marie, vers 75-80°, pendant une demi-heure, en agitant de temps à autre.

La condensation étant terminée, on rend le liquide nettement alcalin par addition de $0^{cm3},5$ à 1^{cm3} de lessive de soude, puis on entraîne complètement [1] la diméthylaniline en excès par un courant de vapeur d'eau, ce qui exige 5 à 10 minutes environ. Le liquide trouble est filtré et le léger résidu insoluble, mis en suspension dans 5 à 10 centimètres cubes d'eau acidulée par l'acide acétique, est additionné de quelques centimètres cubes d une suspension de bioxyde de plomb (2 grammes pour 100 centimètres cubes d'eau). On porte à l'ébullition ; le liquide se colore en bleu pur s'il y a de l'aldéhyde formique.

555. — Il est facile d'utiliser la réaction ci-dessus à la recherche de l'alcool méthylique. Dans ce cas, on commence par oxyder le liquide à étudier. On mélange 50 centimètres cubes de ce liquide avec 10 centimètres cubes d'acide sulfurique à 50 $^0/_0$ et on ajoute 5 grammes de bichromate de potassium pulvérisé ; après dissolution, on distille et on recherche l'aldéhyde

---

[1] S'il restait de la diméthylaniline, on obtiendrait au début, au lieu du bleu, une coloration verte instable.

formique dans le liquide distillé. Si l'on faisait la recherche dans l'alcool ordinaire, il conviendrait de rejeter les premiers centimètres cubes du liquide distillé, qui renferment surtout l'aldéhyde ordinaire.

Fixation de l'azote par les bactéries

556. — L'azote gazeux de l'air est fixé directement par de nombreuses espèces bactériennes qui l'utilisent pour la synthèse des substances protéiques.

C'est le cas pour le *Bacillus radicicola*, qui existe dans les nodosités des racines de pois, de luzerne, etc., et d'autres plantes de la famille des Légumineuses.

On peut mettre la fixation d'azote en évidence dans les cultures de ce microbe sur milieu sucré.

557. — *Préparation du milieu de culture.* On commence par préparer un milieu de culture convenable en faisant bouillir 50 grammes de haricots blancs secs avec 250 centimètres cubes d'eau, dans un ballon, jusqu'à ce que les haricots commencent à crever. On jette sur un tamis, on complète le volume à 250 centimètres cubes, on fait dissoudre dans le liquide 5 grammes de saccharose, puis on filtre.

On mesure 100 centimètres cubes exactement de ce bouillon de haricots et on les verse dans un matras à fond plat d'environ 1 litre, de manière à ce que le liquide ait une épaisseur de 1 à 2 centimètres environ ; on prépare un second matras exactement semblable, et on les stérilise tous deux à l'autoclave, à 110°, pendant vingt minutes.

558. — *Isolement de la bactérie des nodosités.* Les 50 centimètres cubes de bouillon de haricots qui restent sont versés dans un matras et additionnés de 0gr,75 de gélose, coupée en petits fragments avec des ciseaux. On neutralise en cas de besoin avec quelques gouttes de soude étendue et on fait bouillir doucement pen-

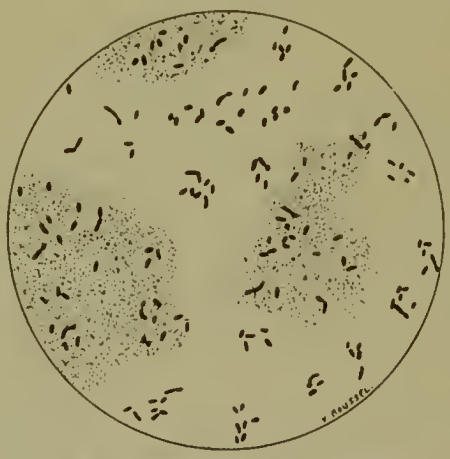


Fig. 60. — Bactérie des nodosités.

dant une demi-heure, puis on porte à l'autoclave et on chauffe à 120° pendant encore une demi-heure, afin de dissoudre la gélose. Le liquide est filtré bouillant sur papier Chardin et réparti aussitôt dans des tubes à essai (4 à 5 centimètres cubes dans chaque tube). On stérilise à 110°, pendant vingt minutes, et on dispose les tubes afin d'avoir, après solidification, des tubes de gélose inclinée.

Pour isoler la bactérie, on se procure des pieds de pois ou de luzerne portant des nodosités sur leurs racines ; on lave et on essuie, puis on brûle délicatement, avec un agitateur porté au rouge, la surface extérieure d'une

nodosité, afin de la stériliser. On enfonce la pointe d'une pipette stérile au milieu de la partie brûlée, de manière à arriver jusqu'au centre de la nodosité, et on aspire dans la pipette une goutte de liquide, avec laquelle on fait un isolement par stries sur les tubes de gélose inclinée (§ **462**). Ce liquide, étalé sur une lame, séché, fixé et coloré à la fuchsine diluée, montre des quantités de microbes des nodosités (*fig.* 60).

Les tubes de gélose sont abandonnés à une température qui ne doit pas excéder 25°.

Après 4 à 5 jours, on a des colonies transparentes, d'aspect visqueux, qui se développent peu à peu en recouvrant la gélose d'une couche épaisse.

559. — *Mise en culture et dosage de l'azote fixé.* On ensemence, avec toutes les précautions d'usage, une colonie de *B. radicicola* dans un des ballons contenant 100 centimètres cubes de bouillon de haricots préparés au préalable (l'autre sert de témoin) ; les deux ballons sont maintenus à 25° environ pendant au moins un mois.

Après ce temps, on voit que le microbe s'est développé en donnant une zooglée abondante, visqueuse, qui remplit tout le liquide. Il a utilisé le sucre pour ce développement et a fixé en même temps l'azote de l'air.

On peut s'en rendre compte en dosant l'azote fixé. Pour cela, on transvase le contenu de chaque matras dans une capsule de porcelaine, on lave et on ajoute les eaux de lavage, puis on évapore à 10 centimètres cubes à peu près sur le bain-marie. On verse le liquide dans un petit ballon de 125 centimètres cubes, on rince la capsule avec 5 centimètres cubes d'acide sulfurique

que l'on verse dans le ballon, et on recommence encore deux fois ce lavage à l'acide. Finalement on ajoute une goutte de mercure, et on termine l'attaque sulfurique comme au § **38**.

La différence entre les quantités d'azote dosées dans la culture et dans le témoin indique le poids d'azote fixé.

DONNÉES NUMÉRIQUES

Poids atomiques des principaux éléments

Les noms en caractères gras sont ceux des éléments qui ont été signalés chez les êtres vivants

	Symbole	Poids atomique		Symbole	Poids atomique
Aluminium	Al	27,1	**Magnésium**	Mg	24,32
Antimoine	Sb	120,2	**Manganèse**	Mn	54,93
Argent	Ag	107,88	Mercure	Hg	200,6
Argon	A	39,9	**Molybdène**	Mo	96,0
Arsenic	As	74,96	Nickel	Ni	58,68
Azote	N	14,01	Or	Au	197,2
Baryum	Ba	137,37	Osmium	Os	190,9
Bismuth	Bi	208,0	**Oxygène**	O	16,00
Bore	B	11,0	Palladium	Pd	106, 7
Brome	Br	79,92	**Phosphore**	P	31,04
Cadmium	Cd	112,40	Platine	Pt	195,2
Cœsium	Cs	132,81	**Plomb**	Pb	207,10
Calcium	Ca	40,07	**Potassium**	K	39,10
Carbone	C	12,00	Radium	Ra	226,4
Cérium	Ce	140,25	Rhodium	Rh	102,9
Chlore	Cl	35,46	**Rubidium**	Rb	85,45
Chrome	Cr	52,0	Ruthénium	Ru	101,7
Cobalt	Co	58,97	Sélénium	Se	79,2
Cuivre	Cu	63,57	**Silicium**	Si	28,3
Etain	Sn	119,0	**Sodium**	Na	23,00
Fer	Fe	55,84	**Soufre**	S	32,07
Fluor	F	19,0	**Strontium**	Sr	87,62
Gallium	Ga	69,9	Tellure	Te	127,5
Glucinium	Gl	9,1	Thallium	Tl	204,0
Hélium	He	4,0	Thorium	Th	232,4
Hydrogène	H	1,008	Titane	Ti	48,1
Indium	In	114,8	Tungstène	W	184,0
Iode	I	126,92	Uranium	U	238,5
Iridium	Ir	193,1	**Vanadium**	V	51,0
Lanthane	La	139,0	**Zinc**	Zn	65,37
Lithium	Li	6,94	Zirconium	Zr	90,6

Densités correspondant aux degrés Baumé

Liquides plus lourds que l'eau

Degré Baumé	Densité	Degré Baumé	Densité	Degré Baumé	Densité
0	1,000	23	1,190	46	1,468
1	1,007	24	1,200	47	1,483
2	1,014	25	1,210	48	1,498
3	1,022	26	1,220	49	1,514
4	1,029	27	1,231	50	1,530
5	1,037	28	1,241	51	1,546
6	1,045	29	1,252	52	1,563
7	1,052	30	1,263	53	1,580
8	1,060	31	1,274	54	1,597
9	1,067	32	1,285	55	1,615
10	1,075	33	1,297	56	1,634
11	1,083	34	1,308	57	1,652
12	1,091	35	1,320	58	1,671
13	1,100	36	1,332	59	1,691
14	1,108	37	1,345	60	1,710
15	1,116	38	1,357	61	1,732
16	1,125	39	1,370	62	1,753
17	1,134	40	1,383	63	1,775
18	1,142	41	1,397	64	1,796
19	1,152	42	1,410	65	1,820
20	1,162	43	1,424	66	1,842
21	1,171	44	1,438	67	1,865
22	1,180	45	1,453		

Liquides plus légers que l'eau

Degré Baumé	Densité	Degré Baumé	Densité	Degré Baumé	Densité
10	1,000	21	0,927	40	0,823
11	0,993	22	0,921	45	0,800
12	0,986	23	0,915	50	0,778
13	0,979	24	0,909	55	0,757
14	0,972	25	0,903	60	0,737
15	0,965	26	0,897	70	0,700
16	0,959	27	0,892	80	0,666
17	0,952	28	0,886	90	0,636
18	0,946	29	0,880	100	0,609
19	0,939	30	0,875		
20	0,933	35	0,848		

Densités des solutions aqueuses d'ammoniaque à 15° (Lunge et Viernik)

Densité	Grammes de NH^3 Dans 100gr	Grammes de NH^3 Dans 100cm3
0,990	2,31	2,29
0,980	4,80	4,70
0,970	7,31	7,09
0,960	9,91	9,51
0,950	12,74	12,10
0,940	15,63	14,69
0,930	18,61	17,34
0,926	19,87	18,42
0,924	20,49	18,93
0,922	21,12	19,47
0,918	22,39	20,56
0,914	23,68	21,63
0,910	24,99	22,74
0,906	26,31	23,83
0,902	27,65	24,94
0,898	29,01	26,05
0,894	30,37	27,15
0,890	31,75	28,26
0,886	33,25	29,46
0,882	34,95	30,83

Densités des solutions aqueuses de potasse à 15° (Lunge)

Densité	Degré Baumé	Grammes de KOH Dans 100gr	Grammes de KOH Dans 100cm3
1,014	2	1,7	1,7
1,029	4	3,5	3,6
1,045	6	5,6	5,8
1,060	8	7,4	7,8
1,075	10	9,2	9,9
1,091	12	10,9	11,9
1,108	14	12,9	14,3
1,125	16	14,8	16,7
1,142	18	16,5	18,8

Densités des solutions aqueuses de potasse à 15° (Lunge) (*suite*)

Densité	Degré Baumé	Grammes de KOH Dans 100gr	Grammes de KOH Dans 100cm3
1,162	20	18,6	21,6
1,180	22	20,5	24,2
1,200	24	22,4	26,9
1,220	26	24,2	29,5
1,241	28	26,1	32,4
1,263	30	28,0	35,3
1,285	32	29,8	38,5
1,308	34	31,8	41,6
1,320	35	32,7	43,2
1,332	36	33,7	44,9
1,345	37	34,9	46,9
1,357	38	35,9	48,7
1,383	40	37,8	52,2
1,410	42	39,9	56,3
1,438	44	42,1	60,5
1,468	46	44,6	65,5
1,498	48	47,1	70,6
1,530	50	49,4	75,6
1,563	52	51,9	81,1
1,597	54	54,5	87,0
1,634	56	57,5	94,0

Densités des solutions aqueuses de soude à 15° (Lunge)

Densité	Degré Baumé	Grammes de NaOH Dans 100gr	Grammes de NaOH Dans 100cm3
1,014	2	1,20	1,20
1,029	4	2,71	2,80
1,045	6	4,00	4,20
1,060	8	5,29	5,60
1,075	10	6,55	7,00
1,091	12	8,00	8,70
1,108	14	9,42	10,40
1,125	16	10,97	12,30
1,142	18	12,64	14,40
1,162	20	14,37	16,70
1,180	22	15,91	18,80
1,200	24	17,67	21,20

Densités des solutions aqueuses de soude à 15° (Lunge) (*Suite*)

Densité	Degré Baumé	Grammes de NaoH Dans 100gr	Grammes de NaoH Dans 100cm3
1,220	26	19,58	23,90
1,241	28	21,42	26,60
1,263	30	23,67	29,90
1,285	32	25,80	33,20
1,308	34	27,80	36,40
1,320	35	28,83	38,10
1,332	36	29,93	39,90
1,345	37	31,22	42,00
1,357	38	32,47	44,10
1,383	40	34,96	48,30
1,410	42	37,47	52,80
1,438	44	39,99	57,50
1,468	46	42,83	62,90
1,498	48	46,15	69,10
1,530	50	49,02	75,00

Densités de l'acide chlorhydrique à 15° (Lunge et Marchlewski)

Densité	Degré Baumé	Grammes de HCl dans 100gr	Grammes de HCl dans 100cm3	Centimètres cubes de HCl à 22° B. dans 100cm3
1,015	2,1	3,12	3,20	7,5
1,030	4,1	6,15	6,40	15,1
1,045	6,0	9,16	9,60	22,8
1,060	8,0	12,19	12,90	30,9
1,075	10,0	15,18	16,30	39,0
1,090	11,9	18,11	19,70	47,3
1,105	13,6	20,97	23,20	55,5
1,120	15,4	23,82	26,70	63,9
1,135	17,1	26,70	30,30	72,5
1,150	18,8	29,57	34,00	81,4
1,165	20,3	32,49	37,90	87,5
1,170	20,9	33,46	39,20	93,7
1,175	21,4	34,42	40,40	96,8
1,180	22,0	35,39	41,80	100,0
1,185	22,5	36,31	43,00	
1,190	23,0	37,23	44,30	
1,195	23,5	38,16	45,60	
1,200	24,0	39,11	46,90	

Densités de l'acide nitrique à 15°
(Lunge et Rey)

Densité	Degré Baumé	Grammes de NO^3H dans 100^{gr}	Grammes de NO^3H dans 100^{cm3}	Centimètres cubes de NO^3H à 36° B. dans 100^{cm3}
—	—	—	—	—
1,015	2,1	2,80	2,80	4,0
1,030	4,1	5,50	5,70	8,0
1,045	6,0	8,13	8,50	12,0
1,060	8,0	10,68	11,30	16,0
1,075	10,0	13,15	14,10	20,0
1,090	11,9	15,53	16,90	24,0
1,105	13,6	17,89	19,80	28,1
1,120	15,4	20,23	22,70	32,2
1,135	17,1	22,54	25,60	36,4
1,150	18,8	24,88	28,60	40,6
1,165	20,3	27,12	31,60	44,9
1,180	22,0	29,38	34,70	49,3
1,195	23,5	31,62	37,80	53,6
1,210	25,0	33,82	40,90	58,1
1,225	26,4	36,03	44,10	62,6
1,240	27,9	38,29	47,50	67,5
1,255	29,3	40,58	50,90	72,4
1,270	30,6	42,87	54,40	77,3
1,285	32,0	45,18	58,10	82,5
1,300	33,3	47,49	61,70	87,7
1,315	34,6	49,89	65,60	93,2
1,325	35,4	51,53	68,30	97,0
1,330	35,8	52,37	69,70	99,1
1,3325	36,0	52,80	70,40	100,0
1,335	36,2	53,22	71,00	
1,350	37,4	55,79	75,30	
1,360	38,2	57,57	78,30	
1,370	39,0	59,39	81,40	
1,380	39,8	61,27	84,60	
1,3833	40,0	61,92	85,70	
1,390	40,5	63,23	87,90	
1,420	42,7	69,80	99,10	
1,450	44,8	77,28	112,10	
1,480	46,8	86,05	127,40	
1,495	47,8	91,60	136,90	
1,508	48,5	97,50	147,00	
1,520	49,4	99,67	151,50	

Densités de l'acide sulfurique à 15°
(Lunge et Isler)

Densité	Degré Baumé	Grammes de SO^4H^2 dans 100gr	Grammes de SO^4H^2 dans 100cm3	Centimètres cubes de SO^4H^2 à 66° B. dans 100cm3
—	—	—	—	—
1,020	2,7	3,03	3,10	1,7
1,040	5,4	5,96	6,20	3,4
1,060	8,0	8,77	9,30	5,2
1,080	10,6	11,60	12,50	6,9
1,100	13,0	14,35	15,80	8,8
1,120	15,4	17,01	19,10	10,6
1,140	17,7	19,61	22,30	12,4
1,160	19,8	22,19	25,70	14,3
1,180	22,0	24,76	29,20	16,2
1,200	24,0	27,32	32,80	18,2
1,220	26,0	29,84	36,40	20,2
1,240	27,9	32,28	40,00	22,2
1,260	29,7	34,57	43,50	24,2
1,280	31,5	36,87	47,20	26,2
1,300	33,3	39,19	51,00	28,3
1,320	35,0	41,50	54,80	30,4
1,340	36,6	43,74	58,60	32,6
1,360	38,2	45,88	62,40	34,7
1,380	39,8	48,00	66,20	36,8
1,400	41,2	50,11	70,20	39,0
1,420	42,7	52,15	74,00	41,1
1,440	44,1	54,07	77,90	43,3
1,460	45,4	55,97	81,70	45,4
1,480	46,8	57,83	85,60	47,6
1,500	48,1	59,70	89,60	49,8
1,520	49,4	61,59	93,60	52,0
1,540	50,6	63,43	97,70	54,3
1,560	51,8	65,08	101,50	56,4
1,580	53,0	66,71	105,40	58,6
1,600	54,1	68,51	109,60	60,9
1,620	55,2	70,32	113,90	63,3
1,640	56,3	71,99	118,10	65,6
1,660	57,4	73,64	122,20	67,9
1,680	58,4	75,42	126,70	70,4
1,700	59,5	77,17	131,20	72,9
1,720	60,4	78,92	135,70	75,4
1,740	61,4	80,68	140,40	78,0
1,760	62,3	82,44	145,10	80,6
1,780	63,2	84,50	150,40	83,6

Densités de l'acide sulfurique à 15° (Lunge et Isler) (*suite*)

Densité	Degré Baumé	Grammes de SO^4H^2 dans 100gr	Grammes de SO^4H^2 dans 100cm3	Centimètres cubes de SO^4H^2 à 66° B. dans 100cm3
1,800	64,2	86,90	156,40	86,9
1,820	65,0	90,05	163,90	91,1
1,835	65,7	93,43	171,30	95,2
1,840	65,9	95,60	175,90	97,8
1,8415	66,0	97,70	179,90	100,0
1,840	»	99,20	182,50	
1,8385	»	99,95	182,80	

Quantité d'eau à ajouter à un alcool de titre donné pour le ramener à un titre inférieur

La quantité d'eau à ajouter à 100 centimètres cubes de l'alcool donné se trouve à l'intersection de la colonne verticale surmontée du titre de l'alcool (en caractères gras) et de la colonne horizontale portant à gauche le titre cherché.

Titre cherché :	96°	95°	90°	80°	70°	60°	50°
95°.....	1,25						
90°.....	7,7	6,4					
85°.....	14,7	13,3	6,6				
80°.....	22,4	20,9	13,8				
75°.....	31,1	29,5	21,9	7,2			
70°.....	40,8	39,2	31,1	15,3			
65°.....	52,0	50,2	41,5	24,7	8,1		
60°.....	64,9	63,0	53,6	35,4	17,6		
55°.....	80,1	78,0	67,9	48,1	28,6	9,5	
50°.....	98,1	95,9	84,7	63,0	41,7	20,5	
45°.....	120,1	117,6	105,3	81,4	57,8	34,5	11,4
40°.....	147,2	144,5	130,8	104,0	77,6	51,4	25,5
35°.....	181,8	178,7	163,8	132,9	102,8	70,1	43,6
30°.....	227,7	224,1	206,2	171,0	136,3	101,7	67,4
25°.....	291,6	287,3	266,1	224,3	182,8	141,6	100,7
20°.....	387,2	381,9	355,8	304,0	252,6	201,4	150,5
15°.....	546,6	539,7	505,3	436,8	368,8	301,1	233,6
10°.....	865,1	855,5	804,5	702,9	601,6	500,5	399,8

Tensions de la vapeur d'eau en millimètres de mercure de 10° à 30°

Température	Tensions	Température	Tensions
10°	9,1	21°	18,5
11	9,8	22	19,6
12	10,4	23	20,8
13	11,1	24	22,1
14	11,9	25	23,5
15	12,7	26	25,0
16	13,5	27	26,5
17	14,4	28	28,1
18	15,3	29	29,7
19	16,3	30	31,5
20	17,4		

Solubilité de quelques corps à diverses températures dans 100 parties d'eau

	0°	20°	40°	60°	100°
$Ba(OH)^2 + 8H^2O$	»	7,4	16,5	48	»
$Na^2CO^3 + 10H^2O$	21	93	1142 (à 38°)	»	540
$NaHCO^3$	9	11	13	15,6	»
$BaCl^2$	31	36	41	46	59
$HgCl^2$	5,7	7,4	9,6	13,7	54
NaCl	35,5	36	36,6	37,2	39,6
NH^4Cl	28	37	46	55	73
$AgNO^3$	122	230	390	540	940
KNO^3	13	31	64	111	247
$Na^2HPO^4 + 12H^2O$	»	17,2	»	»	>300
$CaSO^4 + 2H^2O$	0,19	0,20	0,21	0,21	0,17
$CuSO^4 + 5H^2O$	31,6	42,3	56,9	77,3	203,3
$MgSO^4 + 7H^2O$	76,9	119,8	179,5	»	671,2
$Na^2SO^4 + 10H^2O$	12,2	58,3	412 (à 34°)	»	»
$(NH^4)^2SO^4$	71,0	76,3	81,6	86,9	97,5
$ZnSO^4 + 7H^2O$	115	161	224	313	654
Bitartrate de K	0,3	0,6	1,3	2,4	6,9
Acide oxalique	5,2	13,9	35	75	>350

Données numériques relatives aux sucres et à leurs principaux dérivés

	Point de fusion	$[\alpha]_D$ dans les solutions à 10 %
	—	—
l-xylose	165-166°	+ 18,84
l-arabinose	159-160°	+ 102,65
Rhamnose	108°	+ 9,1
d-fructose (ou lévulose)	95° environ	— 101,38 + 0,56*t* (1)
d-glucose	144-146°	+ 52,5
d-galactose	162°	+ 84,36 — 0,21*t*
d-mannose	132°	+ 13,92
d-sorbose	178-179°	— 42,80
Saccharose	160° environ	+ 66,50
Lactose	204°	+ 54,52
Maltose	»	+ 130,5
Mannose-hydrazone	198-199°	
Xylosazone	166°	
Arabinosazone	143°	
Glucosazone	230-232°	
Galactosazone	214°	
Sorbosazone	159°	
Lactosazone	200° environ	
Maltosazone	206°	
Mannite	168°	
Inosite ordre inactive	224°	

Tableau des constantes des principales matières grasses

	Indice de saponification	Indice d'iode	Densité à 15°
	—	—	—
Triacéline	772,0	»	1,155
Tributyrine	557,3	»	1,052
Monobutyrine	346,3	»	1,088
Huile de lin	192-195	173-201	0,932-0,937
— de noix	195	145	0,925-0,926

(1) Dans ces formules, *t* désigne la température en degrés centigrades. Les pouvoirs rotatoires se calculent en faisant la *somme algébrique* du terme invariable et du terme variable avec la température.

Tableau des constantes des principales matières grasses (*suite*)

	Indice de saponification	Indice d'iode	Densité à 15°
Huile d'œillette.....	195	133-143	0,924-0,927
— de coton.....	193-195	108-110	0,922-0,930
— d'arachide.....	190-196	83-100	0,916-0,920
— d'amande douce..	191	96-99	0,918-0,920
— d'olive	185-196	79-88	0,916-0,920
— de ricin.....	183-186	83-86	0,963-0,968
— de maïs.....	188-193	111-130	0,920-0,925
— de colza.....	170-179	94-102	0,914-0,917
— de foie de morue.	171-189	167	0,922-0,927
— de pied de bœuf..	194,3	69,3-70,4	0,913-0,916
— de palme.....	196-202	51,5	0,921-0,925
— de coco (coprah).	246-260	8-9,5	0,925-0,926
Beurre de cacao.....	193,5	32-41	0,964-0,976
— de vache.....	227	26-38	0,910-0,913
Suif de bœuf.....	193-200	38-46	0,943-0,952
Saindoux	195,4	50-70	0,934-0,938
Cire d'abeilles.....	90-98	7,9-11	0,962-0,966

TABLE ALPHABÉTIQUE

A

Acétate basique de plomb, solution, 108.
Acétique (acide) caractères, 143.
— recherche, 152.
— dosage dans le vinaigre, 153.
— recherche et dosage dans les cultures, 411.
Acétique (éther) de la mannite, 111.
Acétique (fermentation), 380.
Acétique (ferment), isolement, 382.
Acétone, recherche, 405.
— — dans l'urine, 406.
— dosage, 407.
Acétylméthylcarbinol, recherche, 408.
Acidalbumines, réactions, 242.
Acides, voir au nom de chacun d'eux.
Acides gras, formation par saponification, 172.
— non saturés, séparation, 173.
Acide normal, préparation, 27.
Acides dérivés des sucres, 75.
Acides volatils, caractères généraux, 140.
— — recherche et dosage d'après Duclaux, 411.
— (Tableau pour la détermination des), 142.
Acroléine, formation, 177.
Adénine (picrate d'), séparation, 274.
Alanine, dosage, 253.
Albumine, séparation d'avec la globuline, 226.
— cristallisation, 228.
— recherche dans l'urine, 235.
— dosage dans l'urine, 237.
Albumoses, formation, 240.
— caractères, 242.
Alcalialbumines, 242.
Alcalinité des cendres, dosage, 30.
Alcaloïdes, réactions de précipitation, 208.
— réactions colorées, 209.
— tableau pour la recherche, 214.
Alcool, recherche, 394.
— dosage de petites quantités, 397.
— dosage dans le vin, 400.
— table pour le mouillage, 454.
— méthylique, recherche, 442.
Alcools dans les essences, dosage, 196.
— — principaux, 198.
Alcoolique (fermentation), 376.
Alcoomètre, 401.
Aldéhyde ordinaire, recherche, 403.
— — dosage, 404.
— formique, réactions, 440.
Aldéhydes dans les essences, dosage, 198.
— — principaux, 199.
— volatils dans les feuilles, 440.
Amidon, caractères microscopiques, 118.
— dimensions des grains, 120.

Amidon saccharification acide, 122.
— formation de l'empois, 122.
— liquéfaction par l'amylase, 316.
— saccharification diastasique, 317.
Aminés (acides), produits dans l'hydrolyse des protéines, 239.
— caractères, 244.
— dosage, 252.
Ammoniacale (fermentation), 385.
Ammoniacaux (ferments), isolement, 386.
Ammoniaque, distillation et titrage, 24.
— caractères, 428.
— dosage dans les cultures, 430.
— dosage dans l'urine, 431.
— densité des solutions, 449.
Amygdaline, préparation, 134.
— action de l'émulsine, 309.
— dédoublement diastasique, 310.
Amylase du malt, préparation, 315.
— action liquéfiante, 316.
— action saccharifiante, 317.
Anaérobies, isolement, 365.
— gaz des cultures, 389.
Analyse qualitative des cendres, 9.
Antimoniate de potassium, réactif du sodium, 11.
Antiseptiques, 305.
Apiculée (levure), 378.
Arabinose, osazone, 71.
— table pour le dosage, 95.
Arbutine, dédoublement par les acides, 137.
— action de l'émulsine, 309.
Argent (nitrate d'), solution décinormale, 44.
— ammoniacal, 177.
Asparagine, caractères, 255.
— hydrolyse, 255.
— dosage, 256.
Aspartique (acide), caractères, 248.
— formation 255.
Aspergillus niger, culture, 436.
— développement, 438.
Assimilation chrorophyllienne, 439.
Atomiques (table des poids), 447.
Atropine, réaction colorée, 212.
Aubin (appareil d'), 21.
Autoclave, emploi, 359.
Azote, recherche, 3.
— dosage, 23.
— fixation par les bactéries, 443.

B

Bacillus radicicola, isolement, 444.
Bacillus subtilis, isolement, 364.
— coloration des spores, 371.
Bactérie du sorbose, isolement, 384.
— culture, 385.
Benzoïque (acide), caractères, 162.
— formation en partant de l'acide hippurique, 247.
Benzoïque (éther), formation, 395.
Beurre, dosage dans le lait, 183.
— constantes, 457.
Biliaires (acides), réactions, 204.
Biliaires (pigments), réactions, 292.
— recherche dans l'urine, 293.
Biuret (réaction du), 223.
— formation, 257.
Bore, recherche dans le vin, 20.
Bougie filtrante, emploi, 390.
Bouillon de haricots, 443.
Bouillon de viande gélosé, 365.
Brome, recherche, 15.
Brucine, réactif des nitrates, 36.
— réaction colorée, 210.
Butyrique (acide), caractères, 143.
— recherche et dosage, 411.
Butyrique (fermentation), 387.
— gaz produits, 389.
Butyrique (ferment), isolement, 389.

C

Cadmium (xylonobromure de), 75.
Caféine, réaction, 276.
— dosage, 282.
Calcium, recherche dans les cendres, 13.

Calcium cristallisation de l'oxalate, 144.
Cannelle (essence de), dosage de l'aldéhyde cinnamique, 198.
Carbone, recherche, 1.
Carbonique (acide) dans la fermentation alcoolique, 377.
— dans la fermentation butyrique, 389.
Carmin aluné, préparation, 132.
Carotène, extraction des feuilles, 300.
— réactions colorées, 301.
Caséine, préparation, 269.
— dosage, 277.
Catalase, préparation, 351.
— mesure de l'action, 351.
Cellulose, dissolution, 128.
— réactions colorées, 130.
— hydrolyse acide, 131.
— recherche dans les tissus, 131.
Cendres, analyse qualitative, 9.
— dosage de l'alcalinité, 30.
— dosage, 42.
Centrifugation, 124.
Champignons, recherche de la laccase, 336.
— macération glycérinée, 336.
— action de la tyrosinase de, 341.
Chlorhydrique (acide), densité des solutions, 451.
Chloroiodure de zinc, préparation, 130.
Chlorophylle, préparation d'une solution, 296.
— spectroscopie, 297.
— relations avec l'hémoglobine, 299.
Chlorophyllienne(assimilation), 439.
Chloroplatinate de potassium, 10.
Chlorures, recherche, 9.
— dosage dans l'urine, 43.
Cholestérine, réactions, 201.
— dosage dans les tissus, 206.
Choline, caractérisation, 190.
Cinchonine, réaction, 210.
Citrique (acide), caractère, 151.
— recherche dans le lait, 152.
Clastases, 349.
Coagulation des substances protéiques, 221.
Coagulation du lait par la présure, 326.
— diastasique du sang, 328.
Cocaïne, réactions, 212.
Codéine, réactif de la glycérine, 178.
— réaction colorée, 211.
Coloration des tissus végétaux, 131.
— des matières grasses dans les coupes, 172.
— des microbes, 369.
— double des spores, 371.
— de Gram. 373.
Compte-gouttes pour le dosage de l'alcool, 397.
Cuivre, recherche dans le sang d'escargot, 18.
— réactif à la formaldoxime, 19.
— tables de correspondance avec les divers sucres, 92.
Cupropotassique (réactif), préparation, 61.
— dans la recherche du sucre, 62.
— dans le dosage du sucre, 98.
— titrage. 99.
Cyanhydrique (acide), formation, 310.
— caractères, 310.
— dosage, 311.
— (glucosides), recherche dans les feuilles, 314.
Cyanures alcalins, réactions, 4.
— de potassium, solution décime, 280.

D

Décoloration des produits d'hydrolyse, 253.
— des préparations, 371.
Défécation des liquides sucrés, 107.
Degrés alcooliques, table de correction, 402.
Denigès (réactif de), 151.
Densités des produits de saccharification de l'amidon, 320.
— correspondant aux degrés Baumé, 448.
— des solutions d'ammoniaque, 449.

Densités des solutions de potasse, 449.
— — de soude, 450.
— — d'acide chlorhydrique, 451.
— — d'acide nitrique, 452.
— — d'acide sulfurique, 453.
Dextrinase du malt, préparation, 315.
Dextrine, formation, 317.
Diastases, généralités, 303.
— classification, 305.
— localisation, 314.
— séparation d'avec les microbes, 390.
Dioxycétone, formation, 384.
Diphénylamine, réactif des nitrates, 36.
Distillation dans le vide, 135.
Données numériques, 447.

E

Eau, dosage, 39.
Eau de levure, 377.
— alcoolisée, 383.
— glycérinée, 384.
Eau oxygénée, emploi, 347.
— titrage, 352.
Édestine, préparation, 231.
— cristallisation, 233.
Emulsine, préparation, 308.
— action sur les glucosides. 309.
Ensemencement, 361.
Essences végétales, caractères, 192.
— extraction, 193.
— dosage des éthers, 194.
— dosage des alcools, 196.
— dosage des aldéhydes, 198.
— dosage des phénols, 200.
Essence d'amandes amères, formation, 310.
Essences de Wintergreen, saponification, 164.
Essorage à la trompe, 114.
Ethers, dans les essences, dosage, 194.
— — principaux, 195.
Éthyle (acétate et butyrate d') saponification diastasique, 322.
Éthyle (benzoate d'), formation, 395.
Extraction à l'éther, 138.

F

Fehling (liqueur de), préparation, 61.
— emploi dans la recherche, 62.
— pour le dosage du sucre, 98.
— titrage, 99.
Fer, recherche dans les cendres, 13.
— dans le sang, 18.
— dosage dans le sang, 32.
Fermentation alcoolique, 376.
— lactique, 379.
— acétique, 380.
— ammoniacale, 385.
— butyrique, 387.
Ferratine, extraction, 271.
Fibrine, conservation, 332.
Fibrinogène, préparation, 229.
Filtration à la bougie, 390.
Filtre à amiante pour dosage du sucre, 87.
Fixation des microbes, 368.
— de l'azote par les bactéries, 443.
Fleur de vin, 381.
Florence (cristaux de), 190.
Formaldoxime, réactif du cuivre, 19.
Formique (acide), caractères, 141.
— recherche et dosage dans les cultures, 411.
Formique (aldéhyde), réactions, 440.
Fuchsine de Ziehl, 342.
— (réactif à la) pour le brome, 16.
Furfurique (réaction) des sucres, 64.
— des substances protéiques, 225.
Furfurol, production, 66.
— réactions, 66.

G

Gaïac (teinture de), préparation, 336.
Gaïacol, caractères, 160.
Galactose, osazone, 70.
— recherche par l'acide mucique, 79.
— table pour le dosage, 94.
Gallois (réactif de) pour l'inosite, 117.
Gélatine, emploi, 358.
Gélose, emploi, 358.
Girofle (essence de), dosage de l'eugénol, 201.
Gliadine, préparation, 234.
Globuline, séparation, 226.
Glucosazone, 69.
Glucoprotéides, caractères, 265.
Glucoses, généralités, 59.
— action des alcalis, 60.
— propriétés réductrices, 61.
— réactions colorées, 64.
Glucose, recherche par l'acide saccharique, 78.
— table pour le dosage, 92.
— dosage polarimétrique, 104.
Glucosides, dédoublement par les acides, 137.
— action de l'émulsine, 309.
— localisation dans les graines, 314.
— cyanhydriques, recherche dans les feuilles, 314.
Glutamique (acide), préparation, 248.
Gluten, extraction, 234.
Gluténine, préparation, 235.
Glycérine, réactions, 177.
— recherche dans le vin, 179.
Glycocolle, caractères, 246.
— préparation, 245.
Glycogène, extraction des mollusques, 123.
— purification, 126.
— recherche dans le foie, 126.
— dans la levure, 127.
— saccharification par la salive, 319.
Glycolytique (ferment) du sang, 353.
Glyoxylique (acide), réactif, 224.
Glyoxylique (réaction) des substances protéiques, 224.
Gommes solubles, caractères, 128.
Gram (méthode de) pour la coloration des microbes, 373.
— modifiée par Nicolle, 374.
Gras (acides) non saturés, 173.
Grasses (matières), caractères, 171.
— recherche dans les tissus, 172.
— indice de saponification, 179.
— indice d'iode, 180.
— dosage dans une graine, 182.
— dosage dans le lait, 183.
— dosage dans les tissus, 184.
— tableau des constantes, 457.
Guanine, réaction, 277.

H

Hélianthine, indicateur, 48.
Hématine, formation, 284.
— cristallisation du chlohydrate, 288.
Hémoglobine, cristallisation, 284.
— spectroscopie, 289.
Hexoses, réactions colorées, 64.
Hippurique (acide), caractères, 247.
— hydrolyse, 247.
Hydrogène, produit dans la fermentation butyrique, 389.
Hydrolases, 303.
Hydroquinone, extraction, 138.
— caractères, 160.
— oxydation par la laccase, 338.
Hydrosulfite, réducteur, 290.
Hyposulfite de sodium, liqueur décime, 181.

I

Incinération, 41.
Indice de saponification, 179.
— d'iode, 180.

Indol, recherche des pigments dérivés, 295.
— — dans les cultures, 433.
Inosite, caractères, 116.
Iode, recherche, 14.
— solution dans l'iodure de potassium, 122.
— liqueur décime, 282.
Iodoforme (réaction de l'), 395.
Isolement des germes, 362.
— du *B. subtilis*, 364.
— des anaérobies, 365.
Ivoire végétal, hydrolyse, 127.

L

Laccase, préparation de la solution, 336.
— réactions colorées, 337.
— recherche dans les champignons, 336.
— action des acides, 339.
Lactate de zinc, formation, 147.
— caractères, 148.
— en partant des cultures, 410.
Lactique (acide), caractères, 145.
— titrage d'une solution, 156.
— recherche et extraction, 409.
Lactique (fermentation), 379.
Lactique (ferment), isolement, 379.
Lactose, réaction colorée, 84.
— table pour le dosage, 97.
— dosage dans le lait, 109.
Lactyl-lactique (éther), titrage, 157.
Lait, dosage du lactose, 109.
— recherche de l'acide citrique, 152.
— dosage de la matière grasse, 183.
— — de la caséine, 277.
Lavande (essence de), dosage des éthers, 194.
Lécithine, préparation, 189.
— hydrolyse, 190.
Légumineuses, bactérie des nodosités, 444.
Leucine, caractères, 248.
Lévulose, réaction de Séliwanoff, 65.
Levure, recherche du glycogène, 127.
— préparation de l'acide nucléique, 272.
— isolement en culture pure, 377.
— apiculée, 378.
Lipodiastase du ricin, 324.
Liquéfaction de l'empois d'amidon, 316.

M

Magnésium, recherche dans les cendres, 13.
Malique (acide), caractères, 149.
Malt (extrait de), 315.
Maltosazone, formation, 318.
Maltose, table pour le dosage, 96.
Manganèse, recherche dans les cendres, 16.
— dosage colorimétrique, 31.
Mannite, acétal, 112.
— éther acétique, 111.
Mannocellulose, hydrolyse, 127.
Mannose, formation de l'hydrazone, 67.
— table pour le dosage, 94.
MAQUENNE (bloc de), 74.
Matières grasses, 171.
— protéiques, 219.
— sucrées, 59.
Menthe (essence de), dosage des alcools, 196.
Méthémoglobine, formation, 291.
Méthyle (salicylate de), saponification, 164.
Méthylique (alcool), recherche, 442.
Milieux de culture, 357.
MILLON (réactif de), préparation, 223.
— action sur les phénols, 161.
— action sur les substances protéiques, 223.
— action sur la tyrosine, 250.
Molybdique (réactif), 8.
Monobutyrinase, action sur la monobutyrine, 320.

Monobutyrinase, action sur l'acétate et le butyrate d'éthyle 322.
Monobutyrine, saponification, 320.
Morphine, réactions colorées, 211.
Mucine, préparation, 266.
Mucique (acide), formation, 79.
Murexide (réaction de la), 276.
Mycoderma aceti, formation, 381.
— isolement, 382.
Myrosine, localisation, 314.

N

Naphtylamine β, réactif, 37.
Nicolle, méthode de Gram modifiée, 374.
Nicotine, dosage dans le tabac, 217.
Nitrates, recherche dans le sol, 35.
— — dans les plantes, 36.
Nitrate d'argent décime, préparation, 44.
Nitrique (acide) pour l'oxydation des sucres, 78.
— — densité des solutions, 452.
Nitrites, recherche, 37.
Nodosités (bactérie des), isolement, 444.
Nucléique (acide), préparation, 272.
— hydrolyse, 273.
Nucléoprotéides, généralités, 270.

O

Orangé III, indicateur, 49.
Orcanette acétique, préparation, 172.
Orcine, réactif des sucres, 64.
Osazones, formation, 68.
— aspect, 70.
— points de fusion, 456.
Osmique (acide), réactif des matières grasses, 172.
Ovomucoïde, préparation, 267.
Ovovitelline, préparation, 269.
Oxalique (acide), caractères, 144.
— recherche dans les feuilles, 145.
Oxydases, 336.
— recherche exacte, 344.
Oxygène (dégagement d'), dans l'assimilation chlorophyllienne, 439.
Oxyhémoglobine, cristallisation 284.
— préparation, 287.
— spectroscopie, 289.

P

Papaïne, action sur le sérum, 333.
Pentoses, réactions colorées, 64.
Pepsine commerciale, essai, 330.
Peptones, caractères, 242.
— formation, 241.
Perchlorique (acide), réactif de la potasse, 10.
Permanganate de potassium, solution décime, 353.
Peroxydiastase dans le sang, 346.
— dans le lait, 347.
— recherche en présence des oxydases, 348.
Phénols, coloration avec le chlorure ferrique, 160.
— — avec le réactif de Millon, 161.
— dans les essences, dosage, 200.
— — principaux, 201.
Phénylalanine, caractères, 249.
Phénylhydrazine, action sur les sucres, 67.
— (acétate de), réactif, 68.
Phosphates, action sur les indicateurs colorés, 48.
— titrage, seuls ou mélangés, 50.
Phosphatides, 188.
Phosphoprotéides, 268.
Phosphore, recherche, 7.
Phosphorique (acide), recherche, 8.
— dans les cendres, 13.
— action sur les indicateurs, 48.
— titrage, 50.
— dosage par pesée, 56.

Phosphorique (acide), dosage volumétrique dans l'urine, 54.
Phosphotungstique (acide), 241.
Phtaléine, indicateur, 49.
Picrique (acide), réactif du potassium, 10.
— réduction par les sucres, 64.
Pinène, réaction, 193.
Pipettes Pasteur, préparation, 360.
Poids atomiques, 447.
Point de fusion, détermination par le bloc Maquenne, 73.
— détermination par le tube capillaire, 175.
Polarimètre, réglage, 101.
— emploi, 102.
Polarimétrie, 101.
Potasse, action sur l'amidon, 121.
— solution alcoolique, 180.
— densité des solutions, 449.
Potassium, recherche, 10.
— (antimoniate de), réactif du sodium, 11.
— (bitartrate de), formation, 150.
— (chloroplatinate de), examen au microscope, 11.
Pouvoir rotatoire, détermination, 103.
Présure, action des sels de calcium, 326.
— détermination de la force coagulante, 327.
— végétale de l'artichaut, 325.
Propionique (acide), recherche et dosage, 423.
Protéides, généralités, 265.
Protéines, produits d'hydrolyse, 239.
— animales, séparation, 226.
— végétales, 230.
Protéiques (substances), généralités, 219.
— réactions de précipitation, 220.
— coagulation, 221.
— réactions colorées, 222.
— hydrolyse, 240.
Puriques (composés), réactions, 275.
Puriques (bases), séparations, 273.
— réactions, 275.
Pyrogallol, réaction, 160.
— oxydation par la laccase, 338.

Q

Quinhydrone, formation, 138.
Quinine, réaction colorée, 209.
— dosage dans l'écorce de quinquina, 213.
Quinone, formation, 138.
Quinquina, dosage de la quinine, 213.

R

Raulin (liquide de), préparation, 437.
Résorcine, réactif des sucres cétoniques, 65.
— réactions, 160.
Rhamnose, table pour le dosage, 95.
Rhodizonique (acide), formation, 116.
Ricin (lipodiastase du), 324.

S

Saccharides, généralités, 59.
Saccharique (acide), formation, 78.
Saccharomyces apiculatus, 378.
— *vini*, 381.
Saccharose, interversion, 81.
— dosage polarimétrique, 104.
Salicine, action de l'émulsine, 309.
Salicylique (acide), caractères, 163.
— préparation par l'essence de Wintergreen, 164.
Sang, recherche du fer dans les cendres, 18.
— dosage du fer, 32.
— recherche par les cristaux de Teichmann, 288.
— examen spectroscopique, 289.
— coagulation diastasique, 328.
— peroxydiastase, 346.
— dosage du sucre, 354.

Sang de l'escargot, recherche du cuivre, 18.
Saponification (acides gras formés dans la), 172.
Savons, caractères, 173.
Scatol (pigment dérivé du), recherche, 295.
— recherche dans les cultures, 435.
SCHWEITZER (réactif de), 129.
Séparation des germes, 362.
Sodium, recherche dans les cendres, 11.
Sorbose, table pour le dosage, 95.
Soude, densité des solutions, 450.
Soufre, recherche, 6.
— dans les substances protéiques, 225.
Spectroscope, réglage, 205.
Stérilisation à l'autoclave, 359.
— par filtration, 391.
Strychnine, réaction colorée, 210.
Succinique (acide), caractères, 145.
— dosage dans un liquide fermenté, 155.
Sucrase de la levure, préparation, 306.
— influence de la réaction et de la température, 306.
— influence de la quantité, 307.
Sucrase de l'*Aspergillus niger*, 392.
Sucre, dosage dans l'urine, 107.
— dans un sirop, 109.
— dans le sang, 354.
Sucres, action des alcalis à chaud, 60.
— — isomérisante des alcalis, 72.
— propriétés réductrices, 61.
— réactions colorées, 64.
Sucres réducteurs, dosage, 85.
— recherche en présence de saccharose, 71.
— (tableau pour la recherche des), 82.
Sucres hydrolysables (principaux), 80.
Sucre interverti, table pour le dosage, 93.
Suif, saponification, 172.
Sulfanilique (acide), réactif, 37.
Sulfate mercurique, pour déféquer, 109.
Sulfates, recherche, 9.
— dosage dans l'urine, 169.
Sulfoconjugués urinaires, dosage, 167.
Sulfocyanates, recherche, 38.
— liqueur décime, 45.
Sulfurique (acide), préparation de l'acide normal, 27.
— densité des solutions, 453.

T

Tabac, dosage de la nicotine, 217.
Tannins, caractères, 164.
— dosage, 166.
Tartrate (bi) de potassium, formation, 150.
Tartrique (acide), caractères, 149.
— dosage dans le vin, 158.
Technique bactériologique, 356.
TEICHMANN (cristaux de), 288.
Terpènes, caractères, 192.
— réaction, 193.
Terre (espèces anaérobies de la), isolement, 366.
Thym (essence de), dosage du thymol, 200.
Tissus végétaux, réactions microchimiques, 131.
Trypsine commerciale, essai, 332.
Tryptophane, réactions, 252.
Tungstique (acide phospho), 241.
Tyrosinase (du son), préparation, 340.
— action sur la tyrosine, 341.
— action distinctive sur les peptones, 342.
— séparation d'avec la laccase, 343.
Tyrosine, caractères, 250.
— action de la tyrosinase, 341.

U

Uffelmann (réaction d'), 146.
Urane, solution pour le dosage des phosphates, 55.
Uréase de soja, 334.
Urée, caractères, 257.
— recherche dans l'urine, 257.
— dosage, 258.
— fermentation, 385.
— action de l'uréase, 335.
Urine, dosage des chlorures, 43.
— — de l'acide phosphorique, 54.
— — polarimétrique du sucre, 107.
— — des sulfoconjugués, 167.
— — de l'albumine, 237.
— — de l'acide urique et des bases puriques, 278.
— — de l'urée, 258.
— — de l'ammoniaque, 431.
— recherche de l'albumine, 235.
— — des pigments biliaires, 293.
— — de l'urobiline, 294.
— — des pigments indoxyliques, 295.
— — de l'acétone, 406.
Urique (acide), recherche, 276.
— dosage, 278.
Urobiline, recherche, 294.

V

Valérianique (acide), recherche et dosage, 411.
Vin, dosage de l'acide tartrique, 158.
— — de l'acide succinique, 155.
— recherche de la glycérine, 179.
— dosage de l'acide succinique, 155.
— — de l'alcool, 400.
Vinaigre, dosage de l'acide acétique, 153.
Violet de gentiane aniliné, 374.
Vitelline, préparation, 269.

X

Xanthine, réaction, 277.
Xanthoprotéique (réaction), 222.
Xylonobromure de cadmium, 75.
Xylosazone, 72.
Xylose, table pour le dosage, 95.

Z

Ziehl (fuchsine de), 372.
Zinc (lactates de), caractères, 148.
Zymase de levure, préparation, 349.
— action sur le sucre, 350.

TOURS. — IMPRIMERIE DESLIS FRÈRES ET Cie, 6, RUE GAMBETTA.